

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

# **Endothel und Regulation der Inflammation**

**Überexpression inaktiver Mutanten der kleinen GTP-bindenden Proteine  
RhoA/Rac1/Cdc42 inhibiert die LPS-induzierte Expression von Interleukin-8/CXCL8 in  
humanen mikrovaskulären Endothelzellen**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Rolf Günter Weidmann

aus Detmold

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter:     1. Prof. Dr. med. Norbert Suttorp  
                  2. Prof. Dr. med. Michael Kracht  
                  3. Prof. Dr. rer. nat. Stefan Ludwig

Datum der Promotion: 23.09.2005

## Zusammenfassung

Die durch Lipopolysaccharid (LPS) induzierte frühe Immunantwort ist ein wesentlicher Mechanismus der Infektabwehr durch die angeborene Immunität. Bei starker LPS-Exposition kann es andererseits zur Ausbildung eines septischen Syndroms kommen. Der endothelialen Sekretion von Interleukin-8 (IL-8/CXCL8), das als Chemokin die Migration neutrophiler Granulozyten vermittelt, kommt dabei herausragende Bedeutung zu. Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Relevanz der Rho-Proteine RhoA, Rac1 und Cdc42 für die LPS-induzierte intrazelluläre Signaltransduktion mittels Überexpression inaktiver Mutanten dieser Proteine zu untersuchen.

Diese Untersuchung wurde erschwert durch die schlechte Transfizierbarkeit primärer Endothelzellen und der Endothelzelllinie HPMEC-ST1.6R, die nahezu alle Charakteristika primärer Endothelzellen aufweist. Deshalb wurde eine Methode etabliert, die durch Kotransfektion des Grünen Fluoreszenzproteins (GFP) die flusszytometrische Selektion der transfizierten Zellen anhand ihrer GFP-bedingten Fluoreszenz und die Messung der Expression von IL-8/CXCL8 allein in dieser Population ermöglicht. Damit wurde nachgewiesen, dass die inaktiven Mutanten RhoAN19, Rac1N17 und Cdc42N17 jeweils die LPS-induzierte Expression von IL-8/CXCL8 vermindern. Der quantitative Vergleich zeigte die größte Reduktion nach Transfektion von Rac1N17 um 38 % der Positivkontrolle. Nach Transfektion von RhoAN19 und Cdc42N17 reduzierte sich die LPS-induzierte Expression von IL-8/CXCL8 jeweils um 15 %.

Um zu klären, über welche Transkriptionsfaktoren die untersuchten GTP-bindenden Proteine ihre Wirkung auf die Expression von IL-8/CXCL8 vermitteln, wurde das NF- $\kappa$ B-Reporterplasmid pGL3.BG.6 $\kappa$ B mit den inaktiven Mutanten RhoAN19, Rac1N17 und Cdc42N17 in Zellen der Endothelzelllinie kotransfiziert. Diese Experimente zeigten eine Verminderung der LPS-induzierten Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Rac1N17 und Cdc42N17, aber nicht durch RhoAN19.

Die Zelllinie CHO-3E10 exprimiert einen artifiziellen Reporter unter der Kontrolle eines Fragments aus der Verstärkerregion des Gens für das Endotheliale Leukozyten-Adhäsionsmolekül ELAM-1 (CD62E). Dieses Fragment weist als cis-reaktive Elemente Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B und AP-1 auf. Die Transfektion jeder einzelnen der inaktiven Varianten der drei GTP-bindenden Proteine in Zellen der Linie CHO-3E10 reduzierte die Expression des Reporterproteins nach

Stimulation mit LPS signifikant. Die stärkste Reduktion der Reporterexpression um 51 % der Kontrolle ergab sich unter Rac1N17. Nach Transfektion von RhoAN19 reduzierte sich die Reporterexpression um 25 % und nach Transfektion von Cdc42N17 um 24 %. Damit zeigte sich das gleiche quantitative Muster wie für die Reduktion der Expression von IL-8/CXCL8 in Zellen der Endothelzelllinie HPMEC-ST1.6R.

Zusammengefasst deuten die mit den inaktiven Mutanten RhoAN19, Rac1N17 und Cdc42N17 gewonnenen Ergebnisse darauf hin, dass alle drei GTP-bindenden Proteine an der LPS-induzierten Expression von IL-8/CXCL8 in Endothelzellen mitwirken, wobei Rac1 die größte Bedeutung zukommt. Die Wirkung der einzelnen Proteine auf die Transkriptionsfaktoren, die IL-8/CXCL8 regulieren, sollte genauer untersucht werden.

Um Hilfsmittel für die weitere Klärung des LPS-induzierten Signalweges zu gewinnen, wurden stabil mit den inaktiven Mutanten RhoAN19 und Cdc42N17 transfizierte Zellen der Linie CHO-3E10 selektioniert. Die Expression der Myc-markierten Mutanten in den neu generierten Linien CHO-RhoAN19 und CHO-Cdc42N17 wurde mittels Western-Blot nachgewiesen. Die funktionelle Wirksamkeit der Überexpression wurde anhand der zytomorphologischen Veränderungen fluoreszenz- und konfokalmikroskopisch gezeigt. Die Zelllinien stellen ein Werkzeug für die weitere Klärung der Stellung der GTP-bindenden Proteine RhoA und Cdc42 in der LPS-induzierten Signalkaskade dar.

**Schlagworte:** Endothel, Rho-Proteine, Lipopolysaccharid, Flusszytometrie, GFP

---

## Abstract

The early immune response induced by Lipopolysaccharide (LPS) is a crucial mechanism in fighting off infections by the innate immunity. On the other side high amounts of LPS can lead to the development of a sepsis. In this process the endothelial secretion of interleukin-8 (IL-8/CXCL8), which causes the migration of neutrophilic granulocytes to the site of infection is highly important. The aim of this study was to analyze the relevance of each of the three Rho-proteins RhoA, Rac1 and Cdc42 for the intracellular signal transduction resulting in CXCL8-expression by means of overexpressing inactive mutants of these proteins.

Cells of the human microvascular endothelial cell line HPMEC-ST1.6R show most characteristics of primary endothelial cells and are extremely difficult to transfect. Therefore a method was established, which allowed sorting of successfully transfected cells by cotransfecting a gene encoding for green fluorescence protein (GFP). This method permitted measuring intracellular expression of CXCL8 in the population successfully transfected with plasmids encoding for RhoAN19, Rac1N17 or Cdc42N17 mutants. This experiments demonstrated that the inactive mutants RhoAN19, Rac1N17 and Cdc42N17 each decreased the LPS-induced expression of IL-8/CXCL8. Quantitative comparison showed the greatest reduction of 38 % in CXCL8-expression due to transfection of the Rac1N17 mutant. A decrease of 15 % in CXCL8-expression was found due to transfection of the Cdc42N17 mutant or the RhoAN19 mutant.

In order to analyze which transcription factors are employed by the examined GTP-binding proteins to convey their effect on the expression of IL-8/CXCL8, the NF- $\kappa$ B–reporterplasmid pGL3.BG.6 $\kappa$ B was co-transfected with RhoAN19, Rac1N17 or Cdc42N17 into endothelial cells. These experiments showed a decrease of LPS-induced activation of NF- $\kappa$ B due to Cdc42N17 and Rac1N17, but not RhoAN19.

The LPS-inducible reporter cell line CHO-3E10 used in this study expresses the human CD25-antigene as an artificial reporter protein under the control of a fragment from the enhancer region of the gene for the human endothelial leukocytic adhesionmolecule ELAM-1 (CD62E). The cis-reactive elements in this fragment are the binding sites for the transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1. Transfecting each of the inactive mutants RhoAN19, Rac1N17 or Cdc42N17 in

CHO-3E10 cells significantly reduced the LPS-induced expression of the reporter protein. The greatest reduction in reporter expression of 51 % resulted from transfection with the Rac1N17 mutant. A reduction of 25 % and 24 % resulted from overexpression of the RhoAN19 mutant and the Cdc42N17 mutant respectively. Consequently the same quantitative pattern as in the reduction of endothelial CXCL8-expression was found.

In conclusion, this study demonstrates that overexpression of nonfunctional GTP-binding proteins RhoAN19, Rac1N17 or Cdc42N17 leads to a decrease in endothelial CXCL8-expression. Moreover, CXCL8-expression in endothelial cells transfected with the Rac1N17 mutant was most efficiently reduced when compared to the other mutants. The influence of each of the three Rho-proteins regulating transcription factors have requires further investigation.

In order to create tools to further examine LPS-induced signalling, the CHO-3E10 cell line was stably transfected to express the mutant RhoAN19 or the mutant Cdc42N17. Expression of myc-tagged mutants was proven by using western blot analysis. Overexpression of the mutants was functionally effective and the characteristic morphological changes caused by RhoAN19 and Cdc42N17 could be shown by using fluorescence- and confocal microscopy. Therefore, these cell lines may serve as tools to further investigate the role of GTP-binding proteins in the LPS-induced signalling cascade.

**Keywords:** Endothelium, Rho-proteins, Lipopolysaccharide, Flow Cytometry, GFP

## Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Aktivatorprotein-1
APC	Allophycocyanin
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
b-zip	„basic zipper“, Basis-Reißverschlussmotiv
BSA	„bovine serum albumine“, Rinderserumalbumin
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
CD	„cluster of differentiation“, Gruppe von Differenzierungsantigenen
Cdc42	„cell division cycle 42“, Zellteilungszyklus 42
CHO-3E10	Chinesische Hamster-Ovarialzellen – Klon 3E10, LPS-reagible Reporterzelllinie
C/EBP- $\beta$	„CCAAT/enhancer-binding protein- $\beta$ “, CCAAT-Verstärkersequenz-bindendes Protein- $\beta$
Cy5	Cyanin-5
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECSIT	Evolutionär konserviertes Intermediat im Toll-Signalweg
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“, Verstärktes Grünes Fluoreszenzprotein
ELAM-1/CD62E	Endotheliales Leukozyten-Adhäsionsmolekül-1
ELISA	„Enzyme-linked Immunosorbend Assay“, Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest
EMSA	„electrophoretic mobility shift assay“, Gel-Retentionsanalyse
FACS	„fluorescence-aided cell sorting“, Flusszytometrie-assoziierte Zellsortierung
FCS	„fetal calf serum“, Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FI	Fluoreszenz
Flt-1/VEGFR1	„fms-like tyrosine kinase-1“/„vascular endothelial growth factor receptor-1“
GFP	„green fluorescent protein“, Grünes Fluoreszenzprotein
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
GEF	„GDP/GTP-exchange-factor“, GDP/GTP-Austausch-Faktor
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	GDP-Dissoziations-Inhibitoren
HEK	„human embryonic kidney cells“, Humane Embryonale Nierenzellen

---

HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-CoenzymA
HPMEC	Humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen
HUVEC	Humane umbilikalvenöse Endothelzellen
ICAM-1/CD54	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül-1
IL-1/CXCL1	Interleukin-1
IL-6/CXCL6	Interleukin-6
IL-8/CXCL8	Interleukin-8
IHRES	„internal ribosomal entry site“, Interne Ribosomale Eintrittsstelle
I $\kappa$ B	Inhibitor von NF- $\kappa$ B
kDa	Kilo Dalton
KDR/VEGFR2	„kinase insert domain receptor“/„vascular endothelial growth factor receptor-1“
LPS	Lipopolysaccharid
luc	„Luciferase“
MCP-1	„Monocyte chemoattractant Protein-1“
mRNA	messenger RNA
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor- $\kappa$ B
NT	Neurotensin
Oct-1	„Octamer-binding transcription factor-1“
PBS +/-	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Kalzium und Magnesium
PMA	Phorbolmyristatacetat
Rac1	„Ras-related C3 botulinum toxin substrate-1“, Ras-verwandtes Substrat der Botulinus-C3-Transferase
Ras	„rat sarcoma“, Rattensarkomprotein
RhoA	„Ras-homologous member A“, Ras-homologes Protein A
PECAM-1/CD31	Plättchen-Endothelzell-Adhäsionsmolekül-1
siRNA	„short interfering RNA“, kurze interferierende RNA
SDS	„Sodium-Dodecyl-Sulfat“
SP	Substanz P
SV 40	„Simian Virus 40“, Affenvirus 40
TcdB	Toxin B von <i>Clostridium difficile</i>
TIR	Toll-IL-1R-Domäne
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
u	„unit“, Einheit
VCAM-1 / CD 106	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
vWF	von Willebrand-Faktor



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Endothel</b>	<b>1</b>
1.1.1	Bedeutung des Endothels für Inflammation und Immunität	1
1.1.2	Endotheliale Aktivierung und die Sepsis	2
1.1.3	Die humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie HPMEC-ST1.6R	3
<b>1.2</b>	<b>Lipopolysaccharid-induzierter Signalweg in Endothelzellen</b>	<b>4</b>
1.2.1	Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien	4
1.2.2	Rezeptorbindung von LPS	5
1.2.3	Humane Toll-like-Rezeptoren	6
1.2.4	Signalkaskade unterhalb TLR-4 in humanen Endothelzellen	7
1.2.5	Kleine GTP-bindende Proteine in der LPS-induzierten Signalkaskade	8
1.2.6	Transkriptionsfaktoren in der Signalkaskade	9
<b>1.3</b>	<b>Kleine GTP-bindende Proteine</b>	<b>12</b>
1.3.1	Die Ras-Superfamilie	12
1.3.2	Molekulares Funktionsprinzip	13
1.3.3	Die Rho-Familie	14
1.3.4	Bakterielle Toxine modifizieren die Aktivität kleiner GTP-bindender Proteine	17
1.3.5	Bedeutung für Zytoskelett und Zellmorphologie	17
1.3.6	Bedeutung für die Transkription	18
1.3.7	Bedeutung von RhoA, Rac1 und Cdc42 für die Expression von IL-8/CXCL8	19
1.3.8	Statine und kleine GTP-bindende Proteine	20
<b>1.4</b>	<b>Interleukin-8 (IL-8/CXCL8)</b>	<b>21</b>
1.4.1	Chemokine	21
1.4.2	Zielzellen und Wirkungen von IL-8/CXCL8 in vitro	22
1.4.3	Wirkungen von IL-8/CXCL8 in vivo und klinische Bedeutung	22
1.4.4	Die Expressionskontrolle von IL-8/CXCL8	23
<b>1.5</b>	<b>DNA-Transfer in humane Endothelzellen</b>	<b>25</b>
1.5.1	Das Grüne Fluoreszenzprotein (GFP) als Reporter der Transfektion	25
1.5.2	Selektion transformierter Zellen	26

<b>1.6</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>28</b>
<b>2.1</b>	<b>Plasmide, Bakterienkultur, Transformation, Plasmidpräparation</b>	<b>28</b>
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologie</b>	<b>29</b>
<b>2.3</b>	<b>Zelllinien und Zellkultur</b>	<b>30</b>
<b>2.4</b>	<b>Transfektion</b>	<b>31</b>
<b>2.5</b>	<b>Flusszytometrie</b>	<b>31</b>
<b>2.6</b>	<b>Biolumineszenzassay</b>	<b>32</b>
<b>2.7</b>	<b>Western-Blot</b>	<b>32</b>
<b>2.8</b>	<b>Phasenkontrast-, Fluoreszenz- und Konfokalmikroskopie</b>	<b>34</b>
<b>2.9</b>	<b>Spezielle Software und Statistik</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Transformation, Bakterienkultur und Präparation von Plasmid-DNA</b>	<b>35</b>
3.1.1	Transformation	35
3.1.2	Bakterienkultur	35
3.1.3	Plasmidpräparation	36
<b>3.2</b>	<b>Subklonierung der Genvarianten aus pRK5 in pIRES2-EGFP</b>	<b>36</b>
3.2.1	Spezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	38
3.2.2	Aufreinigen von DNA aus enzymatischen Reaktionen	38
3.2.3	Auffüllen überhängender 5'-DNA-Enden mit Klenow-Polymerase	39
3.2.4	Agarosegelelektrophorese	39
3.2.5	Elution elektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente aus Agarosegelen	39
3.2.6	Ligation von einseitig glatt beendeten DNA-Fragmenten und Transformation	40
3.2.7	Identifizierung geeigneter Subklone und DNA-Sequenzierung	40

<b>3.3</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>41</b>
3.3.1	Zellkultur der humanen mikrovaskulären Endothelzelllinie HPMEC-ST1.6R	41
3.3.2	Zellkultur der LPS-reagiblen Reporterzelllinie CHO-3E10	41
<b>3.4</b>	<b>Transfektion und transiente Überexpression inaktiver Genvarianten</b>	<b>42</b>
3.4.1	Transfektion humaner Endothelzellen mit dem Transfektionsreagenz Superfect	42
3.4.2	Transfektion von CHO-3E10-Zellen mit dem Transfektionsreagenz Effectene	42
<b>3.5</b>	<b>GFP-assoziierte selektive durchflusszytometrische Messung</b>	<b>43</b>
3.5.1	Selektive Bestimmung von intrazellulärem IL-8/CXCL8 in transfizierten Endothelzellen	44
3.5.2	Selektive Bestimmung der Reporter-Aktivierung in transfizierten CHO-3E10-Zellen	46
<b>3.6</b>	<b>Luziferasebiolumineszenzassay zur Bestimmung der Aktivierung von NF-κB</b>	<b>48</b>
<b>3.7</b>	<b>Selektion stabil transfizierter Zellen</b>	<b>49</b>
<b>3.8</b>	<b>Western-Blot</b>	<b>50</b>
3.8.1	Proteinextraktion	50
3.8.2	Konzentrationsbestimmung des Proteins im Lysat	51
3.8.3	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
3.8.4	Protein-Blot und Antikörperexposition	51
3.8.5	Detektion des IRDye800-assoziierten Zielproteins mit dem Odyssey- Scanner	52
<b>3.9</b>	<b>Phasenkontrast-, Fluoreszenz- und Konfokalmikroskopie</b>	<b>52</b>
3.9.1	Phasenkontrastmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie	52
3.9.2	Konfokalmikroskopie	53
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Subklonierung von RhoAN19, Rac1N17 und Cdc42N17</b>	<b>54</b>
4.1.1	pRhoAN19-IRES-EGFP	55
4.1.2	pRac1N17-IRES-EGFP	56
4.1.3	pCdc42N17-IRES-EGFP	58
<b>4.2</b>	<b>Zellmorphologie nach Expression von RhoAN19, Rac1N17, Cdc42N17</b>	<b>59</b>
4.2.1	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen der Linie HPMEC-ST1.6R	60
4.2.2	Zellen der LPS-reagiblen Reporterlinie CHO-3E10	61

<b>4.3</b>	<b>Überexpression von RhoAN19, Rac1N17, Cdc42N17 und Expression von IL-8/CXCL8 in Endothelzellen der Linie HPMEC-ST1.6R</b>	<b>62</b>
<b>4.4</b>	<b>Überexpression von RhoAN19, Rac1N17, Cdc42N17 und Aktivierung von NF-<math>\kappa</math>B in Endothelzellen der Linie HPMEC-ST1.6R</b>	<b>67</b>
<b>4.5</b>	<b>Überexpression von RhoAN19, Rac1N17, Cdc42N17 und Aktivierung des LPS-reagiblen Reporters in Zellen der Linie CHO-3E10</b>	<b>68</b>
4.5.1	Die Minderung des LPS-reagiblen Reportersignals ist abhängig vom Ausmaß der Rac1N17-Überexpression	72
<b>4.6</b>	<b>Generation der stabilen Zelllinien CHO-RhoAN19 und CHO-Cdc42N17</b>	<b>75</b>
4.6.1	Nachweis der Expression von Myc-RhoAN19 und Myc-Cdc42N17	75
4.6.2	Zytomorphologie der Linien CHO-3E10, CHO-RhoAN19 und CHO-Cdc42N17	76
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>79</b>
<b>5.1</b>	<b>Methodik der Überexpression inaktiver Mutanten GTP-bindender Proteine</b>	<b>79</b>
<b>5.2</b>	<b>Methoden zur Identifikation der transfizierten Subpopulation</b>	<b>81</b>
5.2.1	Intrazelluläre IL-8/CXCL8-Messung versus ELISA aus dem Überstand	82
5.2.2	Andere Reporter der Transfektion bei flusszytometrischer Bestimmung	82
5.2.3	Detektion GFP-positiver Zellen in den Kanälen Fl-1 bis Fl-4 des FacsCalibur	84
5.2.4	Verhältnis zwischen GFP und Gen von Interesse bei der Überexpression	85
<b>5.3</b>	<b>Zytomorphologie nach Überexpression von RhoAN19, Rac1N17, Cdc42N17</b>	<b>86</b>
<b>5.4</b>	<b>Überexpression von RhoAN19, Rac1N17, Cdc42N17 in humanen Endothelzellen</b>	<b>87</b>
<b>5.5</b>	<b>Überexpression von Rac1N17 und Cdc42N17, aber nicht von RhoAN19 reduziert die Aktivierung von NF-<math>\kappa</math>B in HPMEC-ST1.6R</b>	<b>89</b>
<b>5.6</b>	<b>Überexpression von Rac1N17, Cdc42N17 und von RhoAN19 reduziert die Aktivierung des Reporters in CHO-3E10</b>	<b>93</b>
5.6.1	Die Reporterexpression in CHO-3E10 zeigt das gleiche quantitative Muster wie die Expression von IL-8/CXCL8 in Endothelzellen	93
5.6.2	Minderung des Reportersignals mit steigender Überexpression von Rac1N17	94

---

<b>5.7</b>	<b>Generation der Linien CHO-RhoAN19 und CHO-Cdc42N17</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>108</b>
<b>7.1</b>	<b>Danksagung</b>	<b>108</b>
<b>7.2</b>	<b>Erklärung an Eides statt</b>	<b>109</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Endothel

Den menschlichen Körper invadierende Keime und deren Produkte treten über die Blutzirkulation oder von Gewebeseite in direkten Kontakt mit dem Endothel. Physiologie und Pathophysiologie des Endothels sind daher von wesentlicher Bedeutung für das Verständnis von erfolgreicher Infektabwehr einerseits, persistierender und fortschreitender Infektion andererseits. Das Endothel bedeckt als einschichtige Barriere zwischen Blut und Gewebe eine Fläche von mehr als 1000 m<sup>2</sup>, wobei seine annähernd ca 10<sup>12</sup> Einzelzellen ungefähr 0,1 kg Gesamtmasse haben [Jaffe, 1987]. Neben seiner Bedeutung für die selektive Permeabilität zwischen Blut und Gewebe ist es unter anderem beteiligt an der Regulation von Gefäßtonus und Blutfluss sowie an der Homöostase von Gerinnung und Fibrinolyse. Mit seinen immunmodulatorischen Funktionen nimmt es an der Regulation von Inflammation und Abwehr teil [Aird, 2003].

### 1.1.1 Bedeutung des Endothels für Inflammation und Immunität

Inflammation als Antwort auf die Exposition gegenüber Mikroorganismen oder ihren Bestandteilen, ist nach Celsus gekennzeichnet durch die klassischen Entzündungszeichen Rubor, Calor, Tumor und Dolor [Nathan, 2002]. Auf der Ebene der Gefäße umfasst die Inflammation unter anderem die Dilatation von Arteriolen, Kapillaren und Venolen mit erhöhter Permeabilität und erhöhtem Blutfluss sowie transendothelialer Migration leukozytärer Zellen in das Gewebe [Michiels, 2003]. Wesentliche zelluläre Elemente dieses Prozesses sind Granulozyten, Monozyten und Endothelzellen. Im aktivierten inflammatorischen Zustand werden eine Vielzahl löslicher und zelloberflächengebundener Proteine wie Chemokine und Adhäsionsmoleküle von diesen Zellen exprimiert [Pober und Cotran, 1990]. Diese vermitteln das klinische Bild der inflammatorischen Reaktion. Die frühe Abwehrreaktion gegen Mikroorganismen stützt sich auf das System der angeborenen Immunität [Medzhitov und Janeway, 2000]. Dieses identifiziert über Muster erkennende Rezeptoren, die unter anderem auf phagozytierenden und endothelialen Zellen exprimiert werden, evolutionär konservierte molekulare Strukturen, die jeweils einer Vielzahl an Mikroorganismen gemeinsam sind. Zu diesen Molekülen gehört Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien, das

von Toll-like-Rezeptor-4 erkannt wird und wesentliche Bedeutung für die Pathogenese der Sepsis hat [Chow et al., 1999; Van Amersfoort et al., 2003]. Das Erkennen von LPS durch das Endothel führt über eine zytoplasmatische Signalkaskade zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und konsekutiv zur Transkription abhängiger Gene mit nachfolgender Expression inflammatorischer Zytokine und Adhäsionsmoleküle [Zeuke et al., 2002]. Unter diesen ist Interleukin-8 (IL-8/CXCL8) exemplarisch und von besonderer Bedeutung für die Pathogenese der Sepsis [Andonegui et al., 2003; Hack et al., 1992]. Eine vorhergehende Arbeit zeigte, dass zumindest eines der kleinen GTP-bindenden Proteine für die Expression von IL-8/CXCL8 in Endothelzellen von Bedeutung ist [Hippenstiel et al., 2000]. Deshalb wurde deren Beteiligung in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Überexpression inaktiver Mutanten eingehend untersucht.

### 1.1.2 Endotheliale Aktivierung und die Sepsis

Die Inflammation ist eine adaptive Reaktion des Endothels und essentiell zur Eindämmung und Elimination eines infektiösen Herdes. Die überschießende, generalisierte Aktivierung des Endothels ist gekennzeichnet durch exzessive Expression inflammatorisch wirksamer Proteine, Minderung antikoagulatorischer Faktoren, gestörte Barrierefunktion und endotheliale Apoptose [Peters et al., 2003]. Diese maladaptive Antwort auf Pathogene, darunter insbesondere LPS, trägt wesentlich zur Pathophysiologie des klinischen Syndroms der Sepsis bei [Aird, 2003]. Definierend für die Sepsis ist das Vorhandensein mindestens zweier der klinischen Kriterien des Systemischen Inflammatorischen Antwortsyndroms (SIRS), die sich auf Fieber oder Hypothermie, Tachykardie, Tachypnoe oder Hypokapnie, Leukozytose oder Leukopenie beziehen, und zusätzliche Evidenz für eine ursächliche Infektion [Bone et al., 1992]. Dabei ist die Sepsis ein Kontinuum, das über die Schwere Sepsis, definiert als Sepsis kompliziert durch akute Organdysfunktion, bis zum Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) reicht. Die Inzidenz der Sepsis mit Erregernachweis in der Blutkultur lag 1989 in einer prospektiven Einjahresstudie am Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin bei 8,1 Promille der Krankenhauseinweisungen und die Mortalität bei 20,8 % [Geerdes et al., 1992]. Zahlreiche experimentelle Ansätze in der Therapie der Sepsis zielen auf Elemente der proinflammatorischen und prokoagulatorischen



Signalkaskaden und umfassten bisher unter anderem Antikörper gegen LPS [McCloskey et al., 1994], gegen LPS-Rezeptor-Bestandteile [Verbon et al., 2001], Inhibitoren intrazellulärer Signalmoleküle wie der p38-MAPK [Branger et al., 2002] sowie aktiviertes Protein C [Bernard et al., 2001]. Weil mit diesen Therapieansätzen kaum Erfolge erzielt wurden, wird die Bedeutung der Inflammation für die Pathophysiologie der Sepsis kontrovers diskutiert [Hotchkiss und Karl, 2003]. Allein für den Einsatz von aktiviertem Protein C konnte eine Minderung der sepsisassoziierten Mortalität gezeigt werden [Bernard et al., 2001].

### 1.1.3 Die humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie HPMEC-ST1.6R

Primäre Endothelzellen exprimieren konstitutiv den von Willebrand-Faktor (vWF) [Jaffe et al., 1974], das Plättchen-Endothelzell-Adhäsionsmolekül-1 (PECAM-1/CD31) [Albelda et al., 1990] sowie die Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptoren Flt-1 und KDR [Hewett und Murray, 1996]. Sie reagieren in vitro auf proinflammatorische Stimuli mit der Expression der Zelladhäsionsmoleküle Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül-1 (ICAM-1, CD54), Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1, CD106), Endotheliales Leukozyten-Adhäsionsmolekül-1 (ELAM-1, E-Selektin, CD62E) und der Sekretion inflammatorischer Zytokine, darunter Interleukin-8 (IL-8/CXCL8) und Interleukin-6 (IL-6) [Unger et al., 2002]. Diese zellspezifischen Charakteristika definieren neben einigen weiteren den endothelialen Zelltyp und können zur Identifikation endothelialer Zellen benutzt werden. Die humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzelllinie HPMEC-ST1.6R wurde durch Transformation mit *zwei* Genen, codierend für das *große T-Antigen* aus SV40 und für die humane *Telomerase* generiert [Krump-Konvalinkova et al., 2001]. Sie ist gekennzeichnet durch die Induktion von ICAM-1, ELAM-1 und VCAM-1 nach Stimulation mit LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und durch die Induktion von IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1, GM-CSF nach Exposition gegen LPS [Krump-Konvalinkova et al., 2001]. Der Vorteil dieser Linie gegenüber anderen endothelialen Zelllinien ist damit der weitgehende Erhalt des endothelialen Phänotyps, der vermutlich auf die zusätzliche Expression der humanen Telomerase zurückzuführen ist [Unger et al., 2002]. Im Vergleich zur Nutzung primärer Endothelzellen fällt bei Verwendung der Linie HPMEC-ST1.6R die zeitaufwändige Isolation primärer Zellen, die innerhalb weniger Passagen verschiedene der genannten zellspezifischen Charakteristika verlieren, weg. Daneben ist die Kontaminationswahrscheinlichkeit geringer und die genetische

Variabilität primärer Zellen aus verschiedenen Spenderindividuen entfällt. Die Linie eignet sich daher gut für das Studium der Pathomechanismen der Inflammation am reifen mikrovaskulären Endothel und wurde in dieser Arbeit eingesetzt.

## **1.2 Lipopolysaccharid-induzierter Signalweg in Endothelzellen**

### **1.2.1 Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien**

Lipopolysaccharid (LPS) ist der Hauptbestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Die Membran einer einzelnen *E. coli* enthält annähernd  $3 \times 10^6$  LPS-Moleküle [Nikaido, 1987]. Andere Membranbestandteile sind Glycerolphospholipide und Proteine. Als integraler Bestandteil der bakteriellen Membranstruktur werden die hitzestabilen Lipopolysaccharide der gramnegativen Bakterien als Endotoxine bezeichnet. Durch ihre Rezeptorbindung wird, im Gegensatz zu den sezernierten hitzelabilen, eiweißartigen und meist enzymatisch aktiven Ektotoxinen, das System der angeborenen Immunität aktiviert. LPS wird unter anderem bei bakterieller Zellteilung, Lyse der Zelle oder Interaktion mit dem Komplementsystem aus der äußeren Membran freigesetzt [Van Amersfoort et al., 2003]. Dann kann der eigentlich endotoxisch wirksame Bestandteil des LPS, das Lipid A, die inflammatorischen Wirkungen vermitteln.

Den bis heute untersuchten LPS verschiedener gramnegativer Bakterien ist eine molekulare Grundstruktur gemeinsam, die nach dem Grad ihrer evolutionären Konserviertheit sowie ihrer Bedeutung für das Bakterium und das Immunsystem des Wirts formal in drei Teile gegliedert wird: Kern, Lipid A und O-Kette. Lipid A verankert das LPS-Molekül in der Membran, ist evolutionär maximal konserviert, ist der rezeptorbindende Teil des LPS und damit als einzelne Komponente, auch als rein chemosynthetisches Lipid A, fähig alle endotoxischen Wirkungen des LPS zu vermitteln [Galanos et al., 1985; Rietschel et al., 1994]. Da die O-Kette, bzw. das O-Polysaccharid das wesentliche Antigen ist, das im Wirtsorganismus die adaptive Immunität induziert, wird es auch als O-Antigen bezeichnet. Bakterien, welche die Oberfläche von Schleimhäuten besiedeln, exprimieren oft eine trunkierte O-Kette, die als Lipooligosaccharid (LOS) bezeichnet wird. Die Teile Lipid A und innerer Kern sind evolutionär so hoch konserviert, dass sie für alle

Stämme von *E. coli* und *Salmonella* identisch sind [Erridge et al., 2002]. Dagegen sind für den äußeren Kern von *E. coli* 4 eigene Strukturen und für die O-Kette 160 Serotypen beschrieben [Erridge et al., 2002].

#### 1.2.1.1 Struktur von Lipid A und endotoxische Aktivität

Die Struktur des Lipid A variiert je nach bakterieller Spezies. Diese Strukturvariationen beeinflussen die endotoxische Aktivität des jeweiligen Lipid A. Die Struktur des Lipid A von *E. coli* gilt als nahe am Optimum für das Erkennen durch den humanen LPS-Rezeptor, so dass Lipid A von *E. coli* maximale endotoxische Aktivität zeigt [Rietschel et al., 1994]. Abweichungen von dieser Struktur führen typischerweise zu einer geringeren biologischen Aktivität, wie sie für LPS von *Clamydia trachomatis* [Ingalls et al., 1995] beschrieben ist, bis hin zur antagonistischen biologischen Aktivität, die für das Lipid A von *Rodobacter sphaeroides* [Qureshi et al., 1991] nachgewiesen wurde.

#### 1.2.1.2 Lipopolysaccharid von *Escherichia coli*

*E. coli* ist als einer der wesentlichen Kommensalen im menschlichen Darm ein notwendiger Bestandteil für die Physiologie des Gastrointestinaltraktes, und der Darm enthält einige Gramm an LPS von *E. coli* [Erridge et al., 2002]. Unter physiologischen Umständen gelangt ein sehr begrenzter Teil davon in den Portalkreislauf und wird von Kupfer-Zellen der Leber über nicht stimulierende Wege degradiert. Unter pathophysiologischen Bedingungen können größere Mengen LPS aus dem Gastrointestinaltrakt in den Kreislauf gelangen und die LPS-abhängigen Signalwege aktivieren [Erridge et al., 2002; Martinez-Pellus et al., 1997]. Das in dieser Arbeit eingesetzte LPS wurde aus *E. coli*, Serotyp O111:B4, aufgereinigt.

#### 1.2.2 Rezeptorbindung von LPS

Endothelzellen binden Lipopolysaccharid gramnegativer Bakterien an ihrer Zelloberfläche über einen Rezeptorkomplex, der zumindest die drei Komponenten sCD14 [Pugin et al., 1993], Toll-like Rezeptor-4 (TLR-4) [Zeuke et al., 2002] und MD-2 [Shimazu et al., 1999] enthält, wobei der transmembranäre TLR-4 die signalweiterleitende Komponente ist [Henneke und Golenbock, 2002]. Dass auch in Endothelzellen die Aktivierung über TLR-4 erfolgt, wurde für eine Linie humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen gezeigt [Faure et al., 2000].

### 1.2.3 Humane Toll-like-Rezeptoren

Der transmembranäre LPS-Rezeptor TLR-4 gehört der Interleukin-1-Rezeptor-Toll-like-Rezeptor-Superfamilie an [Dunne und O'Neill, 2003]. Deren Mitglieder sind durch eine zytosolisch lokalisierte homologe Domäne gekennzeichnet, die nach den zuerst bekannten Mitgliedern dieser Superfamilie, dem menschlichen Interleukin-1-Rezeptor und dem Protein Toll aus *Drosophila melanogaster*, Toll-IL-1-Rezeptor-Domäne (TIR-Domäne) genannt wird [Gay und Keith, 1991]. Der Superfamilie gehören neben humanen Rezeptoren und dem Toll-Protein auch Mitglieder in Pflanzen an. Speziesübergreifend ist die Abwehr von Infektionen das gemeinsame "Thema" im IL-1-TLR-System [O'Neill und Greene, 1998].

Zurzeit sind 10 humane TLRs beschrieben, die verschiedene evolutionär konservierte Strukturen mikrobieller Herkunft, darunter Bestandteile der Zellmembran grampositiver und gramnegativer Bakterien, DNA bakterieller und RNA viraler Herkunft, aber auch körpereigene Strukturen, die in Verbindung mit Gewebeschädigung stehen, z.B. Hitzeschockprotein-60 und Fibrinogen, erkennen [Lien et al., 2002]. Die TLRs werden deshalb auch Muster erkennende Rezeptoren und ihre Liganden pathogen assoziierte molekulare Muster genannt. Allen TLRs ist gemeinsam, dass sie mehr als einen Liganden erkennen und für die Signaltransduktion Rezeptorkomplexe formen, die aus einem Heterodimer verschiedener TLRs oder, wie bei der Signaltransduktion von LPS über TLR-4, aus einem Homodimer desselben TLRs bestehen. Sie werden unter anderem auf Monozyten und Makrophagen, Granulozyten, dendritischen Zellen und Endothelzellen sowie auf Zellen der lymphatischen Gewebe exprimiert. Für verschiedene Zellen wurde gezeigt, dass die Expression nicht allein konstitutiv ist, sondern durch Zellaktivierung reguliert wird [Lien et al., 2002].

Am besten untersucht sind TLR-2 und -4, die u.a. bakterielle Strukturen erkennen. TLR-4 erkennt neben LPS weitere bakterielle Glykolipide, Bestandteile von Mykobakterien und *Aspergillus fumigatus*, Hitzeschockprotein-60, Fibrinogen und wird in Monozyten, Endothelzellen und Granulozyten exprimiert [Lien et al., 2002].

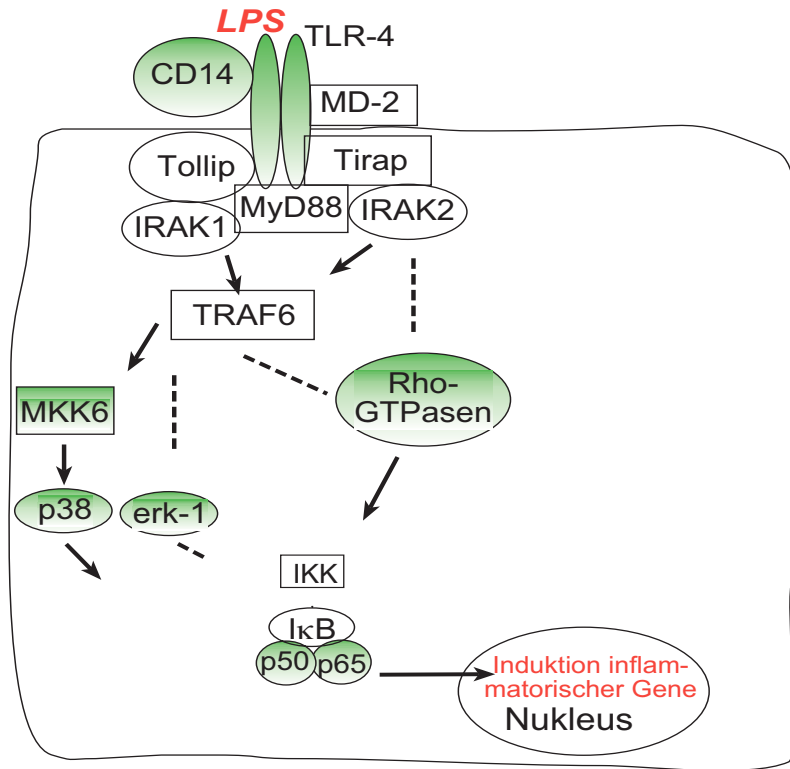
Ob LPS Ligand an TLR-2 oder TLR-4 ist, war zunächst unklar, denn zuerst postulierte eine Arbeit TLR-2 als den LPS-bindenden Rezeptor. Weitere Studien zeigten aber, dass die nicht LPS-sensiblen Mausstämme C3H/HeJ und

C57BL/10ScCr jeweils eine Mutation bezüglich ihres für TLR-4 codierenden Gens aufweisen [Poltorak et al., 1998]. Eine nachfolgend konstruierte TLR-4-defiziente Maus erwies sich ebenfalls als nicht LPS-sensitiv [Hoshino et al., 1999]. Überexpressionsexperimente mit TLR-4 in HEK293-Zellen zeigten dann, dass für die Aktivierbarkeit durch LPS TLR-4 allein hinreichend ist [Chow et al., 1999]. Weitere Studien bewiesen, dass Zellen des Chinesischen Hamsters LPS-sensibel sind, obwohl im Chinesischen Hamster eine natürliche Mutation des TLR-2-Gens vorliegt, die zur Expression eines nicht funktionierenden Proteins führt [Heine et al., 1999]. Diese Ergebnisse wurden mit einer TLR-2-Knockout-Maus bestätigt, die sich ebenfalls als LPS-sensitiv erwies [Takeuchi et al., 1999]. Eine spätere Arbeit legte nahe, dass die vermeintliche Aktivierbarkeit durch LPS via TLR-2 nicht durch LPS, sondern durch Kontaminationen der verwendeten LPS-Zubereitung mit Lipoprotein verursacht wurde [Hirschfeld et al., 2000]. Die kontaminierenden Proteine konnten durch Phenol-Extraktion beseitigt werden. Das in dieser Arbeit verwendete LPS wurde ebenfalls durch Phenol-Extraktion gereinigt. So ist heute Konsens, dass TLR-4 sicher als transmembranärer Rezeptor für LPS fungiert [Beutler und Poltorak, 2000; Medzhitov, 2001]. Ausnahmen sind allerdings beschrieben für LPS von *Porphyromonas gingivalis* und *Leptospira interrogans*, die beide an TLR-2 binden [Lien et al., 2002].

#### 1.2.4 Signalkaskade unterhalb TLR-4 in humanen Endothelzellen

Über die zytoplasmatische Domäne von TLR-4, die TIR-Domäne, wird eine nachfolgende intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, welche jener unterhalb anderer TLRs oder des IL-1-Rezeptors als weitgehend ähnlich gilt [Zhang et al., 1999]. Für diese zytoplasmatische Signalkaskade unterhalb der TIR-Domäne ist in unterschiedlichen Zellen für verschiedene Stimuli eine Vielzahl an Proteinen nachgewiesen. Nach Henneke sind danach in Endothelzellen vermutlich zumindest das myeloid differentiation protein 88 (MyD88) [Medzhitov et al., 1998], die IL-1 receptor associated kinase (IRAK) [Zhang et al., 1999], der tumor necrosis factor associated factor-6 (TRAF-6) [Zhang et al., 1999], das MyD88-adapter-like/TIR domain-containing adapter protein (MAL/TIRAP), das Toll-interacting protein (TOLLIP), das Evolutionär-konservierte Intermediat im Toll-Signalweg (ECSIT) und unterhalb dieser Proteine die MAP-Kinasen [Arditi et al., 1995; Schumann et al., 1996] und Mitglieder der I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B-Superfamilie [Wrighton et al., 1996] in der Signalweiterleitung beteiligt [Henneke und Golenbock, 2002].

Hippenstiel et al. haben die Beteiligung von Rho-GTPasen, MKK6, p38-MAPK und NF- $\kappa$ B bei der LPS-induzierten Expression von Interleukin-8 nachgewiesen [Hippenstiel et al., 2000].



**Abb. 1: LPS-induzierter Signalweg in Endothelzellen**

Grün unterlegte Signalproteine sind in LPS-stimulierten Endothelzellen experimentell nachgewiesen, TLR-4 und CD14 in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen, MKK6, erk-1, p38 und Mitglieder der Rho-Familie in humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVEC). Nicht unterlegte Signalproteine werden vermutet. Die einzelnen Rho-GTPasen im Signalweg werden in dieser Arbeit näher untersucht.

### 1.2.5 Kleine GTP-bindende Proteine in der LPS-induzierten Signalkaskade

Eine Beteiligung kleiner GTP-bindender Proteine aus der Rho-Familie in der LPS-induzierten Signalkaskade in Endothelzellen wurde erstmals durch Verwendung bakterieller Exotoxine aus *Clostridium difficile*, die Proteine der Rho-Familie durch kovalente Modifikation des GTP-bindenden Proteins in ihrer GTPase-Aktivität inhibieren, nachgewiesen [Hippenstiel et al., 2000]. Darauf wird unter 1.3.7 *Bedeutung von RhoA, Rac1 und Cdc42 für die Expression von IL-8/CXCL8* näher eingegangen.

### 1.2.6 Transkriptionsfaktoren in der Signalkaskade

LPS aktiviert über intrazelluläre Signalwege Transkriptionsfaktoren, welche die Expression inflammatorischer Proteine regulieren. Von besonderer Bedeutung für die Inflammation ist der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B [Barnes und Karin, 1997]. Weiterhin wird die Expression inflammatorisch wirksamer Zytokine u.a. auch durch AP-1 [Foletta et al., 1998] und C/EBP [Tengku-Muhammad et al., 2000] reguliert. Diese drei Transkriptionsfaktoren und die in dieser Arbeit verwendete Reporterzelllinie für zwei dieser Faktoren werden nachfolgend vorgestellt.

#### 1.2.6.1 Nukleärer Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)

1986 wurde NF- $\kappa$ B erstmals als nukleärer Faktor, der an ein Verstärkerelement in der Promotorregion des für die Immunglobulin- $\kappa$ -Leichtkette codierenden Gens bindet, identifiziert und wurde zunächst als spezifisch für B-Lymphozyten beschrieben [Sen und Baltimore, 1986]. Es wurde aber schnell deutlich, dass NF- $\kappa$ B als Teil der Superfamilie von NF- $\kappa$ B/Rel-Proteinen ein ubiquitär verbreiteter Transkriptionsfaktor mit evolutionär konservierten Homologen in zahlreichen Spezies von der Fruchtfliege bis zu Säugern ist, und dass NF- $\kappa$ B in der Transkriptionskontrolle schnell induzierbarer Proteine eine zentrale und meist unverzichtbare Rolle spielt [Baldwin, 2001; Silverman und Maniatis, 2001]. NF- $\kappa$ B ist ein Dimer aus verschiedenen Mitgliedern der NF- $\kappa$ B/Rel-Familie, die über ihre gemeinsame evolutionär konservierte Rel-Homologie-Region (RHR) definiert sind. In den meisten Säugerzelltypen ist das p65/p50-Heterodimer am häufigsten vorhanden. Im Zytosol liegt NF- $\kappa$ B als inaktiver Komplex aus dem NF- $\kappa$ B-Dimer und dem Protein I $\kappa$ B vor. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B erfolgt durch proteolytische Degradierung von I $\kappa$ B, folgende Translokation in den Nukleus und Bindung an das NF- $\kappa$ B-Kontrollelement in der Verstärkerregion des abhängigen Gens. Darüberhinaus kann die Phosphorylierung der p65-Untereinheit von NF- $\kappa$ B als ein Mechanismus der Transaktivierung erfolgen [Schmitz et al., 2001].

#### 1.2.6.2 Aktivatorprotein-1 (AP-1)

Aktivatorprotein-1 (AP-1) bezeichnet eine Familie dimerer Transkriptionsfaktoren, die durch Bindungsaktivität für die Sequenz TGACTCA gekennzeichnet ist [Foletta et al., 1998]. Mitglieder der b-zip-Superfamilie formen AP-1, indem sie Homo- oder Heterodimere bilden. AP-1 wurde primär als Protein, das eine regulatorische

Sequenz in der Verstärkerregion des SV-40 bindet, beschrieben [Lee et al., 1987]. Inzwischen wurden Bindungsstellen für AP-1 in einer Vielzahl von Genen eukaryotischer Zellen nachgewiesen, darunter auch in vielen, die für Zytokine und Adhäsionsmoleküle mit immunmodulatorischen Funktionen codieren [Martin et al., 1997; Mukaida et al., 1990; Whitley et al., 1994]. Die Regulation von AP-1 selbst ist komplex, weil eine Reihe verschiedener Proteine aus der b-zip-Gruppe zu AP-1 dimerisieren können und die Transkription dieser Proteine selbst durch mitogene, stressende und inflammatorische Stimuli reguliert wird [Foletta et al., 1998]. Eine inaktivierende Mutation innerhalb der AP-1-Bindungsstelle in der Verstärkerregion des IL-8/CXCL8-Gens reduzierte die IL-1 $\beta$ -stimulierte Reporterexpression in Caco-2-Zellen auf 30 % des Wertes der Wildtypsequenz [Wu et al., 1997].

#### *1.2.6.3 Die Lipopolysaccharid-reagible Reporterlinie CHO-3E10*

Die Reporterzelllinie CHO-3E10 wurde gezielt konstruiert, um den Lipopolysaccharid-induzierten Signalweg zu studieren. Unter Verwendung der Zelllinie wurden die LPS-induzierten Proteine Hop und H411 identifiziert, und sie wurde eingesetzt, um die Frage nach der transmembranären Komponente des LPS-Rezeptors zu klären [Chow et al., 1999]. Die Linie CHO-3E10 ist stabil mit dem humanen Zelloberflächenantigen CD14 und dem Reporterplasmid pUMS(ELAM)-Tac transfiziert. Dieser Vektor enthält als zu exprimierende DNA die für das humane CD25-Antigen codierende cDNA unter der transkriptionellen Kontrolle einer Promotorregion, die aus einem Segment der humanen ELAM-1/CD62E-Verstärkerregion von -241 bis -54 bp relativ zur Stelle des Transkriptionsstarts und einem Minimalpromotor aus dem Hasen- $\beta$ -Globin-Gen zusammengesetzt ist. Das Konstrukt mit dem Fragment aus der ELAM-1/CD62E-Verstärkerregion, enthält Kontrollelemente für die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 [Delude et al., 1998; Jensen und Whitehead, 2003; Whitley et al., 1994]. Die Expression von CD25 in CHO-3E10 ist LPS-reagibel. Die LPS-induzierte Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nukleus sowie die Expression von CD25 an der Zelloberfläche wurden nachgewiesen [Delude et al., 1998].



---

#### 1.2.6.4 CCAAT/Verstärker-bindendes Protein- $\beta$ (C/EBP- $\beta$ )

Der zur C/EBP-Familie gehörigen Transkriptionsfaktor **CCAAT/Enhancer-bindendes Protein- $\beta$**  (C/EBP- $\beta$ ) wurde 1990 als Nukleärer Faktor-Interleukin-6 (NF-IL-6) für die Transkription von Interleukin-6 beschrieben [Akira et al., 1990]. Er transaktiviert die Genexpression durch Bindung an sein cis-Element, die CCAAT-Sequenz [Wedel und Ziegler-Heitbrock, 1995]. C/EBP- $\beta$  gehört zur Superfamilie der Basic-Zipper-Transkriptionsfaktoren, die sich durch zwei homologe konservierte Domänen, die Basic- und die Leucin-Zipper-Region, definieren [Ramji und Foka, 2002]. Über Heterodimere innerhalb der C/EBP-Familie hinaus wurde auch die Dimerisierung mit anderen Mitgliedern der b-zip-Superfamilie mit konsekutiv veränderter Affinität zu entsprechenden Bindungsstellen beschrieben. Weiterhin interagieren C/EBPs mit Transkriptionsfaktoren außerhalb der b-zip-Superfamilie, insbesondere mit NF- $\kappa$ B [LeClair et al., 1992; Stein et al., 1993]. Als Zielgene für die Transkriptionskontrolle durch C/EBP- $\beta$  und weitere Mitglieder der Familie wurden unter anderem eine Vielzahl von in die Immunantwort involvierten Genen wie Zytokingenen in monozytären Zellen [Bretz et al., 1994], ICAM-1 in Endothelzellen [Hou et al., 1994] und für Akute-Phase-Proteine codierende Gene in Leberzellen [Ramji et al., 1993] beschrieben. Für die TNF- $\alpha$ -stimulierte IL-8/CXCL8-Expression in COS- und HeLa-Zellen konnte bei gleichzeitiger Bindung von NF- $\kappa$ B an sein cis-Element eine verbesserte Bindung von C/EBP- $\beta$  an sein Kontrollelement nachgewiesen und ein synergistisches Wirken auf die Transkription gezeigt werden [Stein und Baldwin, 1993]. Für die IL-1 $\beta$ -stimulierte Expression von IL-8/CXCL8 in Caco-2-Zellen wurde ebenfalls ein synergistisches Wirken von C/EBP- $\beta$  mit NF- $\kappa$ B gezeigt [Wu et al., 1997].

### 1.3 Kleine GTP-bindende Proteine

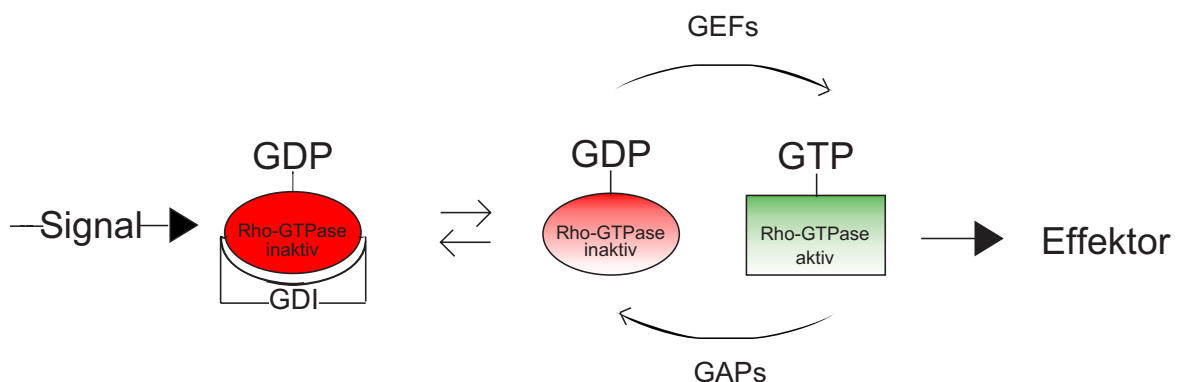
#### 1.3.1 Die Ras-Superfamilie

Die Ras-Superfamilie kleiner GTP-bindender Proteine ist gekennzeichnet durch übereinstimmende Aminosäuresequenzen, welche die molekulare Basis für die Wechselwirkungen mit Guanosindiphosphat (GDP) und Guanosintriphosphat (GTP) der Proteine darstellen. Sie hat Mitglieder in allen untersuchten eukaryoten Spezies. Die kleinen GTP-bindenden Proteine haben intrinsische GTP-hydrolysierende Aktivität, die GTP in GDP und Phosphat umsetzt, und werden deshalb als GTPasen (**Guanosintriphosphatasen**) bezeichnet. Bei ihnen handelt es sich im Unterschied zu den heterotrimeren G-Proteinen, die in ihrer  $\alpha$ -Untereinheit eine homologe GTP-bindende Aminosäuresequenz aufweisen, um monomere Proteine mit Molekularmassen zwischen 20 und 40 kDa [Bourne et al., 1991]. Die für die namengebenden Ras-Proteine (von **rat sarcoma**) codierenden Gene wurden 1978 und 1979 erstmals als Onkogene in den zur Gruppe der Retroviren gehörigen Harvey- und Kirsten-Sarkom-Viren beschrieben, die bei ihrem Wirt, der Ratte, Sarkome induzieren [Shih et al., 1978]. Später wurden ihre korrespondierenden zellulären Proto-Onkogene in humanem Gewebe und ihre mutierten Formen in humanen Krebsgeweben nachgewiesen [Ellis et al., 1981]. Aktivierende Mutationen in Ras Genen finden sich in 10–20 % *aller* humanen Tumorgewebe [Feig et al., 1987], wobei die Inzidenz für *einzelne* Tumorgewebe wesentlich höher liegt, etwa bei 50 % für das Colonkarzinom [Calvert und Frucht, 2002]. Es wurde gezeigt, dass die Ras-Proteine für Zellteilung, Proliferation und Differenzierung bedeutsam sind [Spaargaren et al., 1995]. In Folge wurde eine große Zahl strukturell verwandter kleiner GTP-bindender Proteine mit vielfältigen Funktionen, darunter Regulation des Zytoskeletts, Zellmotilität, Vesikeltransport und Beteiligung in Signalwegen zur Transkriptionskontrolle, beschrieben. Die zurzeit bekannten über 100 Mitglieder der Ras-Superfamilie können nach ihrer Struktur in fünf Subfamilien, die Ras-, Rho-, Rab-, Sar1/Arf- und Ran-Familie, klassifiziert werden [Takai et al., 2001]. Die Mitglieder der Ras-, Rho- und Rab-Familien tragen an ihrem COOH-terminalen Ende spezielle Sequenzen, deren posttranslationelle Substitution mit Lipiden als Voraussetzung für ihre Membranverankerung und damit subzelluläre Lokalisation dient. Diese membranständige Lokalisation ist wiederum eine Voraussetzung für ihre

physiologische Funktion [Zhang und Casey, 1996].

### 1.3.2 Molekulares Funktionsprinzip

Durch ihre GTPase-Aktivität wechseln die kleinen GTP-bindenden Proteine zwischen ihrer aktiven GTP-bindenden Konformation und ihrer inaktiven GDP-bindenden Konformation, wobei Bindung und Hydrolyse des GTP durch verschiedene Proteine, die aktivierenden **GDP/GTP-Exchange-Faktoren** (GEFs) und die inaktivierenden **GTPase-Aktivierenden-Proteine** (GAPs) katalytisch reguliert werden (Abb. 2) [Hall, 1990]. Die GTP-bindenden Proteine wirken auf diese Weise als molekulare Schalter. In ihrer aktiven Konformation aktivieren sie flussabwärtsstehende Effektorproteine. Die Regionen der Konformationsänderung werden Switch1 und Switch2 genannt. Unter anderem für den experimentellen Einsatz negativer Varianten der GTP-bindenden Proteine ist von Bedeutung, dass einige GEFs *in vitro* mehrere verschiedene GTPasen aktivieren können [Feig, 1999]. Die Mitglieder der Rho-Familie werden zusätzlich von **GDP-Dissoziations-Inhibitoren** (GDIs) inhibiert [Ridley, 1997]. Diese GDIs können mit der inaktiven GDP-bindenden Form der Rho-Proteine komplexieren, deren membranverankerndes Lipidmotiv maskieren und so inaktive Proteine im Zytosol lokalisieren. GTPase-Aktivität und Schaltermechanismus sind durch entsprechende Identitäten der Aminosäuresequenz in nahezu allen bekannten GTP-bindenden Proteinen konserviert [Takai et al., 2001]. Die in stetig steigender Anzahl beschriebenen GEFs, GAPs und GDIs bilden die biochemische Grundlage für die komplexe zell- und stimulusspezifische Aktivierung der Rho-GTPasen.



**Abb. 2 : Aktivierung von Rho-Proteinen**, modifiziert nach [Ridley, 1997]

### 1.3.3 Die Rho-Familie

Im Jahr 2003 waren für die Rho-Familie 22 in Säugerzellen exprimierte Mitglieder beschrieben, von denen RhoA, Rac1 und Cdc42 am häufigsten untersucht wurden [Aspenstrom et al., 2003; Etienne-Manneville und Hall, 2002]. Später beschriebene Mitglieder zeigen zum Teil trotz naher Sequenz-Homologie zu RhoA biochemisch und zellbiologisch sehr verschiedene Eigenschaften. So haben die Proteine Rnd1, 2 und 3 *keine* GTPase-Aktivität und sind konstitutiv aktiv, sie sollen in einem Signalweg stehen, der die RhoA-abhängigen zytoskelettalen Wirkungen antagonisiert [van Nieuw Amerongen und van Hinsbergh, 2001]. Für RhoH sind als einzigem der Rho-Proteine direkt onkogene Eigenschaften nachgewiesen. Es ist an der Genese einer Untergruppe von Non-Hodgkin-Lymphomen beteiligt und soll daneben antagonistisch gegenüber anderen Rho-Proteinen bezüglich der Aktivierung der p38-MAPK und des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B wirken [Aspenstrom et al., 2003]. Abbildung 3 zeigt, dass 70 % der Aminosäuresequenz von Rac1 und Cdc42 identisch sind. Beide GTPasen rekrutieren eine gemeinsame Gruppe von Effektoren, die jeweils über eine gemeinsame als Cdc42/Rac-interaktives-Bindungs-Muster (CRIB) bezeichnete Sequenz von 15 Aminosäuren verfügen. Zu den von Rac1 und Cdc42 gemeinsam rekrutierten Effektoren gehört zum Beispiel die Familie der p21-aktivierten Kinase (PAKs). Mit RhoA teilen Rac1/Cdc42 dagegen nur ca. 45 % gemeinsame Aminosäuresequenz, wie Abbildung 3 zeigt. RhoA rekrutiert über spezifische Sequenzen Effektoren wie die Protein-Kinase N (PKN), Rho-Kinase (ROCK) und ihre Homologe, für die keine Interaktion mit Rac1/Cdc42 beschrieben ist [Hakoshima et al., 2003].

RhoA	1	M A A I R K	K L V I	V G D G A C	G K T C L L I	V F S K D Q	F P E V	33
Rac1	1		M Q A I	K C V V V G D G A V	G K T C L L I	S Y T T N A	F P G E	31
Cdc42	1		M Q T I	K C V V V G D G A V	G K T C L L I	S Y T T N K	F P S E	31
RhoA	34	Y V P T V F	E N Y V	A D I E	V D G K Q V	E L A L	W D T A G Q E D Y	66
Rac1	32	Y I P T V F	D N Y S	A N V M	V D G K P V	N L G L	W D T A G Q E D Y	64
Cdc42	32	Y V P T V F	D N Y A	V T V M	T G G E P Y	T L G L	F D T A G Q E D Y	64
RhoA	67	D R L R P L S Y P	D T D V I L	M C F S	I D S P	D S L E N I	P E K W	99
Rac1	65	D R L R P L S Y P	Q T D V F L	I C F S L	V S P A S	F E N V	R A K W	97
Cdc42	65	D R L R P L S Y P	Q T D V F L	V C F S	V V S P S	S F E N V	K E K W	97
RhoA	100	T P E V K	H F C P N V	P I I L V G N K	K D L R N D	E H T R R E	L A	132
Rac1	98	Y P E V R	H H C P N T	P I I L V G T K	L D L R D D	K D T I E K	L K	130
Cdc42	98	V P E I T	H H C P K	T P F L L V G T	Q I D L R D D	P S T I E K	L A	130
RhoA	133	K M K Q E	P V K P E	E G R D M A N R	I G A F G Y M	E C S A K T	K D	165
Rac1	131	E K K L T	P I T Y P Q	G L A M A K E	I G A V K Y L	E C S A L T	Q R	163
Cdc42	131	K N K Q K	P I T P E	T A E K L A	R D L K A V K Y V	E C S A L T	Q K	163
RhoA	166	G V R E	V F E M A T	R A A L	Q A R R G K K	K S G C L V L		193
Rac1	164	G L K T	V F D E A I	R A V L	C P P P V K K	R K C L L L		192
Cdc42	164	G L K N	V F D E A I	L A A L	E P P E P K K	S R R C V L L		191

**Abb. 3: Aminosäuresequenzen für RhoA, Rac1 und Cdc42 (Genbank, NCBI)**

Identische Aminosäuren (AS) sind eingerahmt, RhoA teilt mit Rac1, Cdc42 zu  $\approx 45\%$  gemeinsame AS-Sequenzen, Rac1 und Cdc42 zu  $\approx 70\%$ . Hoch konserviert ist unter anderem der Bereich der inaktivierenden Mutationen RhoAT19N und Rac1/Cdc42T17N, die der inaktivierenden Mutation RasS17N entsprechen. Darstellung der Sequenzen mit SeqVu Alignment Software (Garvan Institute of Medical Research).

#### 1.3.3.1 RhoA (*Ras homologous member A*)

Das erste Gen der Rho-Familie wurde 1985 aus der Nacktschnecke *Aplysia* geklont [Madaule und Axel, 1985]. In der Folge wurden drei hoch konservierte humane Homologe, RhoA, RhoB und RhoC geklont. Zum Beispiel sind die Proteine RhoB und RhoC in Mensch und Maus zu 100 % identisch. Die Aminosäuresequenz von humanem RhoA ist zu 92 % identisch mit humanem RhoC und zu 85 % mit humanem RhoB [Ridley, 1997]. Alle drei GTPasen werden posttranslational modifiziert, wobei RhoA und RhoC mit einer Geranylgeranyl-Gruppe und RhoB zusätzlich mit einer Farnesylgruppe substituiert werden. Entsprechend der unterschiedlichen Isoprenylierung sind RhoA und RhoB an der Plasmamembran lokalisiert, während RhoB primär mit Endosomen und Lysosomen assoziiert ist.

#### 1.3.3.2 Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*)

Rac1 und 2 wurden 1989 [Didsbury et al., 1989], Rac3 1997 jeweils aus humanen Genbibliotheken geklont. Bei den Proteinen handelt es sich um Isoformen, deren

Aminosäuresequenzen zu 89 bis 92 % homolog sind, wobei Rac1 und 3 ubiquitär und Rac2 primär in Zellen der hämatopoetischen Linie exprimiert werden [Haataja et al., 1997]. Wie Rho werden die Rac-Proteine posttranslationell modifiziert, wobei sich Rac3 in der hierfür relevanten C-terminalen Region von Rac1 und 2 unterscheidet. Rac-Proteine können *in vitro* durch die C3-Transferase aus *Clostridium botulinum* ADP-ribosyliert werden und wurden danach benannt, aber die Rac-Proteine sind *nicht in vivo* Substrat der C3-Transferase [Just et al., 1992]. Der Unterschied ist insofern bemerkenswert, als die C3-Transferase vielfach als molekulares Werkzeug zur spezifischen Inhibition von RhoA, B und C eingesetzt wurde, wobei neuere Ergebnisse daneben auch eine Interaktion der C3-Transferase mit der kleinen Ras-GTPase Ral A zeigen [Wilde et al., 2002].

#### 1.3.3.3 Cdc42 (*cell division cycle 42*)

Die Sequenz für Cdc42 wurde 1990 aus einer humanen plazentären Genbibliothek geklont und aufgrund der hohen Sequenzidentität mit dem Gen Cdc42 aus *Saccharomyces cerevisiae*, dessen Genprodukt in der Hefe den Zellzyklus reguliert, Cdc42<sub>HS</sub> (**H**uman **s**ource) genannt [Munemitsu et al., 1990]. Die ektopre Expression von Cdc42<sub>HS</sub> kann in der Hefe eine Funktionsverlustmutante des Hefe-Gens voll ersetzen [Shinjo et al., 1990]. In der humanen Rho-Familie kann Cdc42 mit den GTPasen TC10 und TCL aufgrund einer Identität der Aminosäuresequenzen von ungefähr 80 % zu einer Subgruppe zusammengefasst werden. Cdc42 wird posttranslationell prenyliert und ist subzellulär mit mikrosomalen Membranen assoziiert.

Die Funktion kleiner GTP-bindender Proteine der Rho-Familie wurde in bisherigen Arbeiten vor allem durch den Einsatz aktivitätsverändernder clostridialer Toxine und die Mikroinjektion dominant negativer Proteinmutanten untersucht. Mit diesen Mitteln wurde zuerst ihre das Zytoskelett regulierende Funktion beschrieben. Eine Arbeit, welche die zellabrundende Wirkung des Enzyms C3-Transferase aus *Clostridium botulinum* auf die Inaktivierung von RhoC zurückführte, war dabei wegweisend [Chardin et al., 1989]. Im folgenden werden zunächst die bakteriellen Toxine vorgestellt, anschließend die Wirkungen von Rho-GTPasen auf das Zytoskelett beschrieben und dann ihre Bedeutung für die Transkription und Expression von IL-8/CXCL8 erläutert.

### 1.3.4 Bakterielle Toxine modifizieren die Aktivität kleiner GTP-bindender Proteine

Verschiedene bakterielle Proteine katalysieren die kovalente Modifikation kleiner GTP-bindender Proteine und verändern damit deren biologische Aktivität [Barbieri et al., 2002]. Während der Zytotoxische Nekrotisierende Faktor (CNF) aus *E. coli* GTP-bindende Proteine der Rho-Familie aktiviert [Hoffmann und Schmidt, 2004], wirken verschiedene Toxine aus der Gattung der *Clostridien* inaktivierend auf kleine GTP-bindende Proteine [Schirmer und Aktories, 2004]. Die C3-Transferase aus *Clostridium botulinum* inhibiert RhoA, B und C durch ADP-Ribosylierung an Asparagin 41 [Aktories und Hall, 1989]. Die C3-Transferase ribosyliert keine weiteren Proteine aus der Rho-Familie und wurde in zahlreichen Arbeiten als Werkzeug zur spezifischen Rho-Inhibition eingesetzt. 2002 wurde dann auch eine Wechselwirkung der C3-Transferase mit der kleinen Ras-GTPase RalA nachgewiesen [Wilde et al., 2002]. Das große clostridiale Toxin TcdB-10463 aus dem Stamm 10463 von *Clostridium difficile* inhibiert RhoA, Rac1, Cdc42 durch Glykosylierung. Das Toxin TcdB-1470 aus dem nichthumanpathogenen Stamm 1470 von *Clostridium difficile* blockiert primär Rac1, Cdc42, aber glykosiliert nicht RhoA und modifiziert daneben auch R-Ras und weitere Proteine aus der Ras-Subfamilie kleiner GTP-bindender Proteine [Chaves-Olarte et al., 2003].

### 1.3.5 Bedeutung für Zytoskelett und Zellmorphologie

Die Mikroinjektion von rekombinantem RhoA in T3-Fibroblasten induziert die Bildung von Aktin-Stressfasern und Fokalen Adhäsionen [Ridley und Hall, 1992]. Die Überexpression aktiver Mutanten von RhoA, RhoB und RhoC in porcinen aortalen Endothelzellen zeigte für jede der Mutanten die Induktion von Stressfasern und Fokalen Adhäsionen [Aspenstrom et al., 2003]. Daneben wurde für transfizierte Zellen eine kleine und abgerundete Morphologie beschrieben. Ein wesentlicher Effektor von Rho für die Formierung von Stressfasern ist die Rho-Kinase, welche neben anderen Zielproteinen die regulatorische Myosin-Leichtkette phosphoryliert, so dass konsekutiv aktiviertes Myosin F-Aktin zu Stressfasern bündelt [Essler et al., 2000; Ridley, 1999]. Die Mikroinjektion von rekombinantem Rac1 und die Überexpression von aktivem Rac1V12 induzierte in T3-Fibroblasten die Bildung von Lamellipodien und nachfolgend Stressfasern [Ridley et al., 1992]. Die gleichen charakteristischen Veränderungen werden nach Überexpression von aktivem Rac1, 2 und 3 in porcinen aortalen Endothelzellen beschrieben, wobei die

Bündel von Aktin-Fasern hier nach der Expression von Rac1L61 und Rac2L61 im Vergleich zu klassischen Stressfasern prominenter sind [Aspenstrom et al., 2003]. Wie für RhoA und Rac1 wurde in der ersten Arbeit über die Funktion von *humanem* Cdc42 1995 die Wirkungen auf das Zytoskelett anhand der Mikroinjektion von konstitutiv aktivem Protein in T3-Fibroblasten untersucht [Nobes und Hall, 1995]. In den injizierten Fibroblasten induzierte das rekombinante Protein die Bildung von Filopodien [Nobes und Hall, 1995]. Darüber hinaus wird auch die Bildung von Lamellipodien und Stressfasern beschrieben. Da die Bildung von Lamellipodien und Stressfasern durch Koinjektion von inaktivem Rac und C3-Transferase inhibiert werden konnte, postulierten die Autoren eine sequentielle Aktivierung von Rac und Rho durch Cdc42 [Nobes und Hall, 1995]. Für die Überexpression von aktivem Cdc42L61 in porcinen aortalen Endothelzellen wurde die Induktion von Lamellipodien, vinculinpositiver fokaler Komplexe und prominenter Stressfasern sowie kleiner ringförmiger aktinpositiver intrazellulärer Strukturen 24 Stunden nach Transfektion berichtet [Aspenstrom et al., 2003].

#### 1.3.6 Bedeutung für die Transkription

Die Bedeutung von Mitgliedern der Rho-Familie für weitere zelluläre Prozesse neben ihrer Wirkung auf das Zytoskelett wurde durch Arbeiten belegt, welche die Aktivierung von JNK und p38-MAPK durch aktive Mutanten von Rho-Proteinen zeigten. JNK und p38-MAPK gehören mit den Extrazellulärsignal-regulierten Kinasen (ERK) zu den Mitogenaktivierten Protein-Kinasen (MAPK). Diese vermitteln als ubiquitäre parallele Signalkaskaden z.B. Proliferation, Apoptose, Zellzyklusregulation und Inflammation als Reaktion auf extrazelluläre Reize [Hazzalin und Mahadevan, 2002]. Die Stressaktivierten Protein-Kinasen JNK und die p38-MAPK reagieren auf proinflammatorische Stimuli wie Störungen der osmotischen Homöostase, Hitze, Hypoxie, proinflammatorische Zytokine oder LPS [Kumar et al., 2003] [Kyriakis und Avruch, 2001]. Mehrere Arbeiten beschrieben die Aktivierung von Mitgliedern der Stressaktivierten Protein-Kinase-Familie c-Jun NH<sub>2</sub>-Terminale Kinasen (JNKs) und der p38-MAPK durch Überexpression konstitutiv aktiver Mutanten von Rac1 und Cdc42 in Zellen der Linien HeLa, NIH 3T3, COS und HEK 293T [Bagrodia et al., 1995; Coso et al., 1995; Minden et al., 1995]. Außerdem wurde die Inhibition der IL-1 $\beta$ -induzierten Aktivierung von JNK1



durch die inaktive Mutante Cdc42N17 in COS-Zellen nachgewiesen. Eine aktive Mutante von RhoA stimulierte in den meisten Linien nicht die JNK oder p38-MAPK, aber konnte die JNK in Zellen der Linie HEK 293T genauso wie Cdc42 aktivieren [Teramoto et al., 1996].

Perona wies 1997 für die Überexpression aktiver Mutanten kleiner GTP-bindender Proteine in verschiedenen Zelllinien die Aktivierung eines NF- $\kappa$ B-abhängigen Reporterkonstruktes nach [Perona et al., 1997]. Dies wies auf eine Bedeutung GTP-bindender Proteine der Rho-Familie für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, eines zentralen Transkriptionsfaktors proinflammatorisch wirksamer Proteine, hin.

### 1.3.7 Bedeutung von RhoA, Rac1 und Cdc42 für die Expression von IL-8/CXCL8

Hemmung GTP-bindender Proteine der Rho-Familie durch die Toxine TcdB-10464 und TcdB-1470 in humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur reduzierte die LPS-induzierte Sekretion von IL-8/CXCL8 und hemmte die Aktivierung von NF- $\kappa$ B [Hippenstiel et al., 2000].

Eine weitere Arbeit untersuchte die Bedeutung des kleinen GTP-bindenden Proteins RhoA für die LPS-induzierte Transkription inflammatorischer Mediatoren in primären humanen Monozyten und der humanen monozytären Zelllinie THP-1-CD14 [Chen et al., 2002]. Die Autoren konnten eine LPS-abhängige Aktivierung von RhoA in primären humanen Monozyten nachweisen. Sie zeigten, dass die Überexpression der negativen Mutante RhoAN19 die LPS-induzierte Transkription von IL-8/CXCL8 vermindert.

Einen weiteren Hinweis auf GTP-bindende Proteine im Signalweg flußabwärts von TLR-4 lieferte eine Arbeit, die eine Beteiligung von Rac1 in der durch hitzeinaktivierte *Staphylococcus aureus* induzierten Signaltransduktion unterhalb von TLR-2 nachwies [Arbibe et al., 2000]. Die Autoren zeigten eine Aktivierung der GTP-bindenden Proteine Rac1 und Cdc42 in THP1-CD14 und HEK293-TLR-2 im jeweiligen GTPasen-Aktivitäts-Assay. Allerdings wurde eine verminderte Aktivierung von NF- $\kappa$ B im Luziferasereporterassay in HEK293 nur nach Überexpression der inaktiven Mutante Rac1N17 gezeigt. Die Wirkung auf die Expression inflammatorischer Zytokine wurde in der genannten Arbeit nicht untersucht.

### 1.3.8 Statine und kleine GTP-bindende Proteine

Wie bereits erklärt ist die membranständige Lokalisation kleiner GTP-bindender Proteine eine notwendige Voraussetzung für ihre Funktion. Ein C-terminales CAAX-Peptidmuster der Rho-Proteine vermittelt die posttranslationelle kovalente Substitution mit einem Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Isoprenoid, wobei A für eine aliphatische Aminosäure steht und die Aminosäure an Stelle X beeinflusst, ob das Protein farnesyliert (S,M,A,Q) oder geranylgeranyliert (L) wird [Zhang und Casey, 1996]. Da die Modifikation mit Isoprenoiden auf Farnesyl-PP als Intermediärprodukt der Cholesterinbiosynthese zurückgreift, wirken die als Hemmstoffe der Hydroxymethylglutaryl-CoenzymA (HMGCoA)-Reduktase klinisch eingesetzten Statine inhibitorisch auf kleine GTP-bindende Proteine der Rho-Familie. In Zellkulturstudien konnte eine Hemmung der Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in Endothelzellen und in der monozytären Linie THP-1 durch Statine nachgewiesen werden. Für humane umbilikalvenöse Endothelzellen wurde gezeigt, dass die LPS-induzierte IL-8/CXCL8-Expression durch Lovastatin [Hippenstiel et al., 2000] und die PMA- oder LPS-stimulierte Expression von IL-1 $\beta$  und IL-6 durch Simvastatin und Fluvastatin [Inoue et al., 2000] inhibiert wird. Für die monozytäre Zelllinie THP-1 wurde eine Minderung der Expression von IL-6 und IL-8/CXCL8 durch Statine [Ikeda und Shimada, 1999; Terkeltaub et al., 1994] sowie eine Hemmung der LPS-induzierten Aktivierung von Rac durch Mevastatin im Rac-Aktivitätsassay nachgewiesen [Patel und Corbett, 2003]. Eine prospektive klinische Beobachtungsstudie an 361 Patienten belegte, dass die Vorbehandlung mit Statinen einen präventiven Effekt auf die Entwicklung einer Sepsis hat [Almog et al., 2004]. Die Autoren stellten vorab die Hypothese auf, dass aufgrund der antiinflammatorischen Effekte der Statine ein präventiver Effekt zu erwarten sei [Almog, 2003].

## 1.4 Interleukin-8 (IL-8/CXCL8)

Interleukin-8 (IL-8/CXCL8) wurde erstmals 1987 nach Aufreinigung aus dem Überstand LPS-stimulierter humaner Monozyten als chemotaktischer Faktor für Neutrophile beschrieben [Yoshimura et al., 1987]. Die chemotaktische Wirkung von IL-8/CXCL8 ist besonders stark [Larsen et al., 1989] und gilt als langanhaltend [Strieter und Kunkel, 1994]. Gebildet wird IL-8/CXCL8 von leukozytären Zellen und nicht leukozytären Zellen, darunter Endothelzellen [Strieter et al., 1989] und Epithelzellen [Li et al., 2002]. Da das Endothel an der Gefäß-Gewebe-Grenze die Extravasation leukozytärer Zellen vermittelt kommt der endothelialen Expression von IL-8/CXCL8 besondere Bedeutung zu. Endothelzellen reagieren auf Exposition gegenüber LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  mit der Expression von IL-8/CXCL8 [Strieter et al., 1989]. IL-4 und IL-10 allein induzieren keine IL-8/CXCL8-Expression in Endothelzellen, aber bewirken bei gleichzeitiger Exposition gegenüber LPS eine Erhöhung der LPS-stimulierten Expression von IL-8/CXCL8 um 300% [De Beaux et al., 1995].

### 1.4.1 Chemokine

Mit IL-8/CXCL8 wurde eine Superfamilie strukturell verwandter Zytokine begründet, deren überwiegende Anzahl eine chemotaktische Wirkung auf eine jeweils begrenzte Subpopulation von Leukozyten ausübt [Baggiolini et al., 1997]. Die Mitglieder der mit Interleukin-8 begründeten Superfamilie werden als Chemokine (**chemotactic cytokines**) bezeichnet. Es wurden über 40 verschiedene Chemokine und ca. 20 Chemokinrezeptoren beschrieben [Mahalingam und Karupiah, 1999]. Da die Namengebung oft rein deskriptiv nach der zuerst beschriebenen Funktion erfolgte, aber für viele der Chemokine weitere Wirkungen neben ihrer zumeist primär beschriebenen Chemotaxie nachgewiesen wurden, darunter z. B. angiogenetische Aktivität für Interleukin-8, wurde eine systematische Nomenklatur vorgeschlagen [Murphy et al., 2000]. Bei den Chemokinen handelt es sich um niedermolekulare (8-14kDa) Proteine, die an ihrem aminoterminalen Ende durch Zysteine charakterisiert sind und nach deren Anzahl und Verteilung in die 4 Untergruppen CXC, CC, CX3C (je 4–6 Zysteine) und C (2 Zysteine) unterteilt werden. IL-8/CXCL8 gehört zur Gruppe der CXC Chemokine, deren erste beiden Zysteine durch eine interponierende Aminosäure (X) getrennt sind. Um die Chemokine von ihren Rezeptoren, die eine korrespondierende Nomenklatur verwenden, abzugrenzen, folgt auf die Bezeichnung der Subgruppe ein L für

Ligand. Die folgende Nummer stimmt mit der Nummer in der Nomenklatur der korrespondierenden Gene überein. Die CXC-Gruppe kann hinsichtlich des Vorhandenseins eines aminoterminalen Glu-Leu-Arg-Motivs (ELR-Motivs) vor dem ersten Zystein in CXC-(ELR+) oder CXC-(ELR-) klassifiziert werden, wobei die Mitglieder der CXC-(ELR+)-Gruppe, zu denen auch IL-8/CXCL8 gehört, funktionell durch starke chemotaktische Wirkung insbesondere auf neutrophile Granulozyten und eine starke angiogenetische Potenz gekennzeichnet sind [Strieter, 2002].

#### 1.4.2 Zielzellen und Wirkungen von IL-8/CXCL8 in vitro

Zielzellen sind neben neutrophilen Granulozyten auch T-Lymphozyten [Larsen et al., 1989], Monozyten und nicht leukozytäre Zellen [Mukaida, 2000]. Es wird davon ausgegangen, dass IL-8/CXCL8 aufgrund seiner molekularen Struktur, wie andere Chemokine auch, gut an Proteoglykane des vaskulären Endothels bindet, um dort seine Wirkungen auf Zielzellen auszuüben. Die chemotaktische Wirkung auf Neutrophile ist z. B. Stimulus für die transendotheliale Migration [Huber et al., 1991], wie auch für die Migration über pulmonales Epithel und über Fibroblasten [Mukaida, 2003]. Zusätzlich induziert IL-8/CXCL8 die Degranulation von Neutrophilen und die Generierung reaktiver Sauerstoffmetabolite durch Neutrophile [Djeu et al., 1990; Schroder et al., 1987]. IL-8/CXCL8 ist damit ein zentraler Faktor für die massive Infiltration von Neutrophilen bei akuter Entzündung [Harada et al., 1996]. IL-8/CXCL8 induziert auch die Freisetzung von Histamin aus Basophilen [Dahinden et al., 1989]. Außerdem erhöht IL-8/CXCL-8 endotheliale Permeabilität unabhängig von Granulozyten [Biffl et al., 1995].

#### 1.4.3 Wirkungen von IL-8/CXCL8 in vivo und klinische Bedeutung

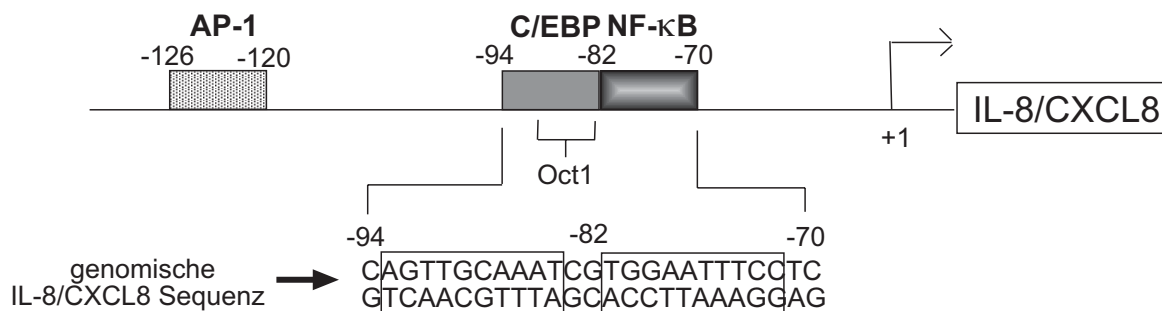
Die chemotaktische Wirkung von IL-8/CXCL8 ist für die physiologische entzündliche Immuneaktion zur Elimination bakterieller Infektionen essentiell [Standiford et al., 1996]. Bei massiver Entzündung kann IL-8/CXCL8 aber auch als Marker der unbalancierten Inflammation nachgewiesen werden. Dies wird durch Korrelationen zwischen klinischer Symptomatik und quantitativem Nachweis von IL-8/CXCL8 belegt: Eine tierexperimentelle Studie an Primaten zeigte, dass nach intravenöser Applikation von *E. coli* und LPS ein letaler Verlauf mit höheren Spiegeln an IL-8/CXCL8 verbunden war als ein nicht tödlicher Verlauf [Van Zee et al., 1991]. Eine klinische Beobachtungsstudie fand bei 89 % Prozent der Patienten

einer mit der Diagnose Sepsis auf die Intensivpflegestation aufgenommenen Patientenpopulation (n=47) erhöhte IL-8/CXCL8 Plasmaspiegel, wobei die erhöhten Plasmaspiegel invers korreliert waren mit zirkulierender Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl und mittlerem arteriellen Druck [Hack et al., 1992]. Diese Studie zeigte auch, Patienten mit der Diagnose septischer Schock wiesen signifikant höhere Plasmaspiegel an IL-8/CXCL8 auf als Patienten ohne die Diagnose Schock. Patienten aus dieser Studie, deren Erkrankung einen letalen Verlauf nahm, wiesen bei Diagnose der Sepsis höhere Spiegel an IL-8/CXCL8 auf als solche mit nicht tödlichem Ausgang [Hack et al., 1992]. Eine weitere Beobachtungsstudie untersuchte die Korrelation zwischen IL-8/CXCL8-Spiegeln in der bronchoalveolären Lavage (BALF) in einem Kollektiv von 29 Patienten mit Risiko für die Entwicklung eines akuten Atemnotsyndroms des Erwachsenen (ARDS) [Donnelly et al., 1993]. Die Spiegel an IL-8/CXCL8 in der BALF von Patienten mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines ARDS korrelierten mit der Entwicklung eines ARDS [Donnelly et al., 1993]. Sie erwiesen sich damit auch als prognostisch bedeutsam. Eine weitere Beobachtungsstudie an 27 Patienten fand höhere IL-8/CXCL8-Spiegel in der BALF von Patienten mit der Diagnose ARDS im Vergleich zu Patienten mit cardiogenem Lungenödem, aber keine signifikant unterschiedlichen Plasmaspiegel an IL-8/CXCL8 zwischen diesen Gruppen [Miller et al., 1996]. Signifikant erhöhte Level an IL-8/CXCL8 konnten auch im Serum und in der bronchoalveolären Lavage von Patienten mit der Diagnose Idiopathische Pulmonale Fibrose und in der bronchoalveolären Lavage von Patienten mit der Diagnose diffuse Panbronchiolitis nachgewiesen werden [Car et al., 1994; Koga, 1993]. Bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung war der Gehalt an IL-8/CXCL8 im Sputum invers korreliert mit dem forcierten endexpiratorischen Volumen in der Lungenfunktionsdiagnostik [Mukaida, 2003].

#### 1.4.4 Die Expressionskontrolle von IL-8/CXCL8

Die konstitutive Expression von IL-8/CXCL8 ist gering, wird aber durch eine Vielzahl von Induktoren massiv gesteigert. Je nach Stimulus und Zellart kann eine Steigerung um den Faktor 10 bis 100 bewirkt werden [Hoffmann et al., 2002]. In humanen Endothelzellen, die aus der Nabelschnur isoliert wurden, konnte nach Stimulation mit 100 ng LPS pro ml Medium eine Steigerung um den Faktor 10 nachgewiesen werden [Hippenstiel et al., 2000]. Die Expression von IL-8/CXCL8 steht unter der Kontrolle der Transkriptionsfaktoren Nukleärer Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B),

CCAAT-Verstärker bindendes Protein- $\beta$  (C/EBP- $\beta$ ) und Aktivatorprotein-1 (AP-1) [Strieter, 2002]. Neben der transkriptionellen Kontrolle wird die Expression auf der Ebene der mRNA-Stabilität weiter reguliert [Kowalski und Denhardt, 1989]. Die Promotorregion des IL-8/CXCL8-Gens ist in Abbildung 4 gezeigt [Wu et al., 1997]. Der Bindungsstelle für NF- $\kappa$ B kommt zwar für die meisten Stimuli die wesentliche Bedeutung in der Induktion der Transkription zu, aber für eine maximale Expression von IL-8/CXCL8 wurde in vielen Zelltypen die Kooperation mit C/EBP oder AP-1 als notwendig nachgewiesen [Kunsch et al., 1994; Matsusaka et al., 1993; Stein und Baldwin, 1993]. Das stimulus- und zellspezifische Zusammenspiel der verschiedenen Transkriptionsfaktoren zeichnet dabei für das quantitativ und zeitlich unterschiedliche Expressionsmuster von IL-8/CXCL8 in den einzelnen Geweben verantwortlich [Roebuck, 1999]. Im nichtinduzierten Status wird die Promotoraktivität durch Bindung des Proteins Oct-1 supprimiert [Wu et al., 1997]. Für humane Endothelzellen konnte bisher die Regulation auf der Ebene der Transkriptionskontrolle und dort die Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B an der Induktion von IL-8/CXCL8 durch LPS nachgewiesen werden [Hippenstiel et al., 2000; Wrighton et al., 1996].



**Abb. 4 : Transkription von IL-8/CXCL8** modifiziert nach [Wu et al., 1997]

Lokalisation der Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren relativ zum Transkriptionsstart. Die funktionelle Bedeutung der in der Abbildung dargestellten Transkriptionsfaktoren wurde für Zellen der Linie Caco-2 nachgewiesen.

## 1.5 DNA-Transfer in humane Endothelzellen

Die Expression eines rekombinanten Proteins setzt den erfolgreichen Transfer der codierenden DNA in die jeweiligen Zielzellen voraus. Die verschiedene Methoden zum DNA-Transfer lassen sich vom Prinzip unterteilen in nicht virale und virale Transfersysteme. Der nicht virale Transfer von Nukleinsäuren in eukaryote Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Die ersten Transfektionsstudien wurden in den späten 1960er und frühen 1970er Jahren von Graham und van der Eb unter Verwendung von Calciumphosphat und von Vaheri und Pagano unter Verwendung von Dextran durchgeführt [Graham und van der Eb, 1973; Pagano et al., 1967]. In den 1980er Jahren wurden lipidbasierte Transfektionsreagenzien, die DNA in Liposomen einschließen, entwickelt. Humane Endothelzellen sind mit den genannten Reagenzien nur sehr schwer zu transfizieren [Axel et al., 2000]. Je nach verwendetem Reagenz, speziellen Bedingungen, verwendetem Reportersystem und Autor werden für humane Endothelzellen im Allgemeinen Transfektionseffizienzen in der Größenordnung von 0,1 bis 10 % der behandelten Zellpopulation berichtet [Kiefer et al., 2004; Martin und Murray, 2000]. Eine deutlich höhere Effizienz des DNA-Transfers wird erreicht, indem mit viralen Systemen die evolutionär entwickelten viralen Mechanismen zum Gentransfer genutzt werden. Virale Vektorsysteme, von denen das erste 1981 von Wei beschrieben wurde, beruhen auf Retroviren, Adenoviren oder dem Adeno-assoziierten Virus (AAV), wobei unter Verwendung adenovirusbasierter Systeme für Endothelzellen Effizienzen von 88–98 % berichtet werden [de Martin et al., 1997; Martin und Murray, 2000; Wei et al., 1981]. Die Infektion von Endothelzellen mit replikationsunfähigen viralen Vektoren ist also bezüglich der Effizienz überlegen und wurde inzwischen auch in der Analyse Rho-abhängiger Signalwege schon eingesetzt [Zhao et al., 2003]. Die Etablierung des Systems ist zeitaufwändig, und seine Anwendung erfordert sicherheitstechnische Voraussetzungen.

### 1.5.1 Das Grüne Fluoreszenzprotein (GFP) als Reporter der Transfektion

Um bis zur Etablierung eines viralen Transfersystems die Wirkung der Überexpression inaktiver Mutanten der GTP-bindenden Proteine auf die IL-8/CXCL8 Expression in humanen Endothelzellen studieren zu können, bestand für diese Arbeit die Notwendigkeit, den geringen Anteil an transfizierten Zellen von nicht transfizierten Zellen zu unterscheiden und selektiv zu messen. Zu den für diesen Zweck entwickelten Methoden gehört die Koexpression eines Oberflächen-

antigens, das später über einen magnetkugelchengekoppelten Antikörper detektiert wird und so die magnetische Separation der transfizierten Zellen ermöglicht. Das System wurde von Chen zur Untersuchung der Bedeutung von RhoAN19 in der LPS-induzierte Sekretion von IL-8/CXCL8 in humanen Monozyten eingesetzt [Chen et al., 2002]. Ein anderer Ansatz, der auch in der vorliegenden Arbeit gewählt wurde, ist die Kotransfektion des Grünen Fluoreszenzproteins (GFP) aus *Aequorea victoria*, das als Reporter für die erfolgreiche Transfektion dient [Trouet et al., 1997]. Das GFP kann sowohl in nativen als auch fixierten Zellen detektiert werden. Die GFP-DNA wurde in ihrer Sequenz für die Expression in Säugerzellen und die Detektion durch für Fluoresceinisothiocyanat (FITC) geeignete Filtersysteme optimiert [Diamond und De Maggio, 2000]. Sie wird gemeinsam mit dem Gen von Interesse transfiziert. Später werden durch die **Flusszytometrie-assoziierte Zell-Sortierung (FACS)** transfizierte Zellen identifiziert und selektiv gemessen. Dabei wird das exprimierte IL-8/CXCL8 nach Hemmung der Ausschleusung intrazellulär quantitativ bestimmt. Schwierigkeiten und Vorteile der Methodik werden in der Diskussion unter 5.2 erläutert.

#### 1.5.2 Selektion transformierter Zellen

Eine weitere Möglichkeit, das Problem niedriger Effizienzen in der Transfektion differenzierter humaner Zellen zu lösen, ist die Generation stabil transfizierter Zelllinien. Solche Linien epithelialer Herkunft wurden von Hobert in der Analyse von Cdc42N17 und Rac1N17 in der durch *Salmonella typhimurum* induzierten Expression von IL-8/CXCL8 in Epithelzellen genutzt [Hobert et al., 2002]. Eine „stabil transfizierte Zelllinie“ geht aus einer mit dem Gen von Interesse transformierten Zelle hervor. Allerdings werden nach Transfektion einer Zellpopulation nur sehr wenige der transfizierten Zellen dauerhaft transformiert, so dass diese relevanten transformierten Zellen mit Hilfe von Selektionsantibiotika selektioniert werden müssen [Liu et al., 2000]. Die gleichzeitige Transfektion eines für ein GFP codierenden Gens ist dabei hilfreich, weil die transfizierte Population im zeitlichen Verlauf kontinuierlich auf transformierte Zellen durchgesehen werden kann.



---

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

In bisherigen Untersuchungen konnte eine Beteiligung von Mitgliedern der Rho-Subfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine in der LPS-induzierten NF- $\kappa$ B-abhängigen Expression von IL-8/CXCL-8 nachgewiesen werden. Der Nachweis gründete sich auf den Einsatz bakterieller Toxine, die durch kovalente Modifikation GTP-bindender Proteine der Rho-Subfamilie als Inhibitoren wirksam sind. Allerdings sind jeweils mehrere GTP-bindende Proteine Substrat der katalytisch aktiven Toxine, so dass eine spezifische Aussage über die Funktion *einzelner* Proteine der Rho-Familie im proinflammatorischen Signalweg nicht zu treffen war. Die Überexpression inaktiver Genvarianten eines Proteins und die anschließende Messung abhängiger Parameter ist dagegen als hochspezifischer Test auf die Funktion dieses *einzelnen* Proteins anerkannt. Als Ausgangspunkt für diese Untersuchung standen inaktive Varianten der für RhoA, Rac1 und Cdc42 codierenden Gene kloniert in den Vektor pRK5 zur Verfügung. Ziel der Arbeit war es, mittels Überexpression zu klären, welche Stellung die drei einzelnen Proteine RhoA, Rac1 und Cdc42 im Signalweg zur Expression des proinflammatorischen IL-8/CXCL8 in humanen Endothelzellen einnehmen. Zu diesem Zweck war die GFP-assoziierte flusszytometrische Messung zu etablieren, welche die selektive Bestimmung von IL-8/CXCL8 im erfolgreich transfizierten Anteil der Zellpopulation erlaubt.

## 2 Materialien

### 2.1 Plasmide, Bakterienkultur, Transformation, Plasmidpräparation

Plasmide aus dem Labor von Prof. Alan Hall, University College London, die Myc-markierte inaktive Mutanten der Gene für RhoA, Rac1 und Cdc42 im Vektor pRK5 [Self und Hall, 1995] enthalten, wurden von Prof. Stefan Ludwig, Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster überlassen.

Die für Varianten des Grünen Fluoreszenzproteins codierenden Plasmide wurden von Gibco, Karlsruhe (pGreenLantern1) und von BD Clontech, Heidelberg (pIRES2-EGFP) bezogen.

Das NF- $\kappa$ B-Reporterplasmid pGL3.BG.6 $\kappa$ B [Schwarzer et al., 1998] wurde von Prof. Robert Newton, Department of Biological Sciences, University of Warwick, Coventry, England zur Verfügung gestellt.

Das für die  $\beta$ -Galaktosidase codierende Plasmid pRSV $\beta$ -Gal wurde von Werner Hallatschek, Institut für Mikrobiologie und Hygiene an der Charité, Universitätsmedizin Berlin überlassen.

#### Bakterienstamm

*E. coli*: TOP10 (Genotyp wie DH10B strain)                      Invitrogen, Karlsruhe

#### Luria-Bertani-Medium

Tryptone	10 g	Sigma, Deisenhofen
Yeast-Extract	5 g	Sigma, Deisenhofen
NaCl	10 g	C. Roth, Karlsruhe
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	

der pH-Wert des LB-Mediums wurde mit 0,1 N NaOH-Lsg. auf 7,0 eingestellt und das Medium für 40 Minuten bei 120°C und 1 bar autoklaviert.

#### Agarplatten

LB-Medium wie oben beschrieben wurde zusätzlich mit 20 g Agar versetzt, nach Autoklavieren wurde die Agarlösung im Wasserbad auf 55°C abgekühlt, dann die jeweiligen Antibiotika in nachstehender Konzentration zugegeben und die Agarplatten mit einem Volumen von ca. 25 ml gegossen.

#### Antibiotika

Ampicillin in LB-Medium und LB-Agar	50 $\mu$ g/ml	
Ampicillin Stocklösung	50 mg/ml in dH <sub>2</sub> O	
Ampicillin		C. Roth, Karlsruhe

Kanamycin in LB-Medium, -Agar	30 µg/ml	
Kanamycin Stocklösung	50 mg/ml in dH <sub>2</sub> O	
Kanamycin Monosulfat		Sigma, Deisenhofen

### Miniplasmidpräparation nach dem Prinzip der Alkalischen Lyse

#### Lösung I

Tris-HCl, pH 8,0	25 mM
Glucose	50 mM
EDTA	10 mM

#### Lösung II

NaOH	0,2 N
SDS	1 %

#### Lösung III

Kaliumacetat	3 M
Essigsäure	2 M

HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
--------------------------	----------------

## **2.2 Molekularbiologie**

Restriktionsendonukleasen und Arbeitspuffer <i>ClaI</i> , <i>XhoI</i> , <i>PstI</i> und <i>EcoRI</i>	Promega, Mannheim
DNA Polymerase 1 Large (Klenow) Mini Kit	Promega, Mannheim
LigaFast Rapid DNA Ligation System	Promega, Mannheim
MiniElute Reaction Cleanup Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

### **Agarosegelelektrophorese**

#### Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Elektrophorese-Puffer 20x

Tris Base (Trizma®)	100 g	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure 100 %	23 ml	Merck, Darmstadt
EDTA 0,5 M pH 8,0	40 ml	Merck, Darmstadt
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	

#### Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Elektrophorese-Puffer 20x

Tris Base (Trizma®)	100 g	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure 100 %	23 ml	Merck, Darmstadt
EDTA 0,5 M pH 8,0	40 ml	Merck, Darmstadt
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	

#### Agarosegel, 1,5 %

Agarose	1,5 g	Promega, Mannheim
TAE-Puffer	100 ml	
Ethidiumbromidlsg. 1%	2,5 µl	Sigma, Deisenhofen
Agarose in TAE-Puffer bis zum Lösen erhitzen, abkühlen und 2,5 µl 1 % Ethidiumbromidlsg. zugeben.		

Auftragepuffer

OrangeG	20 mg	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	2,5 ml	Merck, Darmstadt
EDTA 0,5M pH 8,0	10 ml	Merck, Darmstadt
dH <sub>2</sub> O	2,5 ml	

Ready-Load 1kB DNA-Ladder                      Invitrogen, Karlsruhe

Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System      Bio-Rad, München  
Power NPAC 200                      Bio-Rad, München

### 2.3 Zelllinien und Zellkultur

Zellen der humanen pulmonalen mikrovaskulären Zelllinie HPMEC-ST1.6R [Krump-Konvalinkova et al., 2001] aus dem Labor von Prof. James Kirkpatrick wurden von Frau Dr. Vera Krump-Konvalinkova, Institut für Pathologie der Universität Mainz zur Verfügung gestellt.

Zellen der LPS-reagiblen Linie CHO-3E10 [Delude et al., 1998] aus dem Labor von Prof. Douglas T. Golenbock am Maxwell Finland Laboratory for Infectious Diseases in Boston wurden von Herrn Dr. Norbert Reiling, Laborgruppe Molekulare Infektiologie am Forschungszentrum Borstel überlassen.

**Endothelzellkulturmedium:** 500 ml Medium 199 Earle supplementiert mit 0,3 mg/ml L-Glutamin, 20 % Fötalem Kälberserum, 100 ng/ml Endothelial Cell Growth Supplement, 5 ng Epidermal Growth Factor, 25 ug/ml Natrium-Heparin und 140 units/ml Penicillin/Streptomycin.

**Endothelzellwachstumsmedium:** 50 % Endothelzellkulturmedium wie oben beschrieben und 50 % Endothelial Cell Growth Medium.

**CHO-Zellkulturmedium:** Medium NUT.MIX.F-12(HAM) with GLUTAMAX supplementiert mit 10 % Fötalem Kälberserum und 140 units/ml Penicillin/Streptomycin.

**CHO-Zellwachstumsmedium:** Medium NUT.MIX.F-12(HAM) with GLUTAMAX supplementiert mit 20 % Fötalem Kälberserum und 140 units/ml Penicillin/Streptomycin.

Medium 199 EARLE 1x	Biochrom, Berlin
Medium NUT.MIX.F-12(HAM) with GLUTAMAX	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
Endothelial Cell Growth Medium (ECGM)	PromoCell, Heidelberg
Fötale Kälberserum	PAA Laboratories, Wien
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	BD Discovery Labware, Heidelberg
Epidermal Growth Factor (EGF)	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
Natrium Heparin	Sigma, Deisenhofen

L-Glutamin	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
Accutase	PAA Laboratories, Wien
Hygromycin	Calbiochem, Hamburg
G418 Sulphate	PAA Laboratories, Wien

PBS+/+ (mit $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$ )	Biochrom, Berlin
PBS-/-	PAA Laboratories, Wien
a. d. Spüllösung	Braun, Melsungen
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
<u>Gelatine Stocklösung (0,5 %)</u>	
2,5 g Gelatine (G) auf 500 ml a. d., bei 60°C gelöst, sterilfiltriert und aliquotiert.	
G-Arbeitslösung (0,05 %): 50 ml Stocklösung wurden mit 450 ml a. d. verdünnt.	

## 2.4 Transfektion

Effectene Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Superfect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden

## 2.5 Flusszytometrie

### Antikörper

mouse anti-human IL-8, Clone G265-8,	BD Pharmingen, Heidelberg
Isotype IgG2b, Kat.-Nr. 554717	
mouse IgG2b, Isotype Control, Kat.-Nr. MG2b00	Caltag, Hamburg
goat anti-mouse IgG2b-Cy5, Kat.-Nr. M32411	Caltag, Hamburg
mouse anti-CD25-APC, Clone 2A3,	BD Immunocytometry,
Isotype IgG1, Kat.-Nr. 340907	Heidelberg
mouse gamma1-APC, Isotype Control,	BD Immunocytometry,
Kat.-Nr. 345818	Heidelberg

### Stimulus

Lipopolysaccharid von <i>E.coli</i> 0111:B4,	Sigma, Deisenhofen
Kat.-Nr. 4291	
LPS-Stocklösung	1 mg/ml in PBS+/+
LPS-Arbeitslösung	10 ug/ml in PBS+/+

### Paraformaldehydstocklösung 20 %

Paraformaldehyd	20 g	Sigma, Deisenhofen
dH <sub>2</sub> O	100 ml	
Kochen, bis eine trübe Lösung entsteht, durch Titration mit 1 M NaOH-Lösung aufklären,		
PBS 0,2 M	100 ml zugeben,	Sigma, Deisenhofen
nach Abkühlen filtern, pH auf 7,6 einstellen.		

Paraformaldehydarbeitslösung 2 %: 2 ml Stocklösung auf 18 ml PBS-/-

Saponin von Quillaja Bark  
 Monensinstocklösung 2 mM in PBS+/  
 Monensinarbeitslösung 20 µM in PBS+/  
 Monensin

Sigma, Deisenhofen

Sigma, Deisenhofen

Flusszytometer BD FacsCalibur  
 mit Software Cellquest Pro

BD Biosciences, Heidelberg

Betriebsmittel für Flusszytometer:  
 FACSFlow

BD Biosciences, Heidelberg

## 2.6 Biolumineszenzassay

Luciferase Assay System  
 beta-Gal Reporter Gene Assay  
 Lumat LB 9501/16

Promega, Mannheim  
 Roche, Basel  
 Berthold, Bad Wildbad

## 2.7 Western-Blot

### Antikörper

primärer Ak: mouse anti-human myc-tag (9B11),  
 Isotype IgG2a, monoklonal, Kat.-Nr. 2276  
 sekundärer Ak: goat anti-mouse, IRDye800,  
 Kat.-Nr. 610 131 121

New Eng. Biolabs, Ffm.

Biomol, Hamburg

Blotmembran Immobilion-P PVDF Membran  
 Blotpapier  
 Proteinlaufhöhenmarker BOA-Marker

Millipore, Eschborn  
 C.Roth, Karlsruhe  
 Biomol, Hamburg

### Lyse-Puffer für Proteinextraktion

Tris-HCl	50 mM, pH 7,4
EDTA	0,2 mM
PMSF	1 mM
Antipain, Leupeptin, Pepstatin, je	10 µg/ml
NP-40	1 %

Merck, Darmstadt  
 Sigma, Deisenhofen  
 Sigma, Deisenhofen  
 Sigma, Deisenhofen

### Lösung für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Bradfordreagenz	2 ml	Bio-Rad, München
dH <sub>2</sub> O	8 ml	

### Auftragepuffer nach Lämmli

Tris-HCl	0,5 M, pH 6,8	1,0 ml
Glycerol	100 %	0,8 ml
SDS	10 %	1,6 ml
Bromphenolblau	1 %	0,4 ml
β-Mercaptoethanol	1 %	0,4 ml

Merck, Darmstadt  
 Serva, Heidelberg  
 Pharmacia-Biotech, Freiburg  
 Sigma, Deisenhofen

Sammelgel

Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	2,5 ml
SDS 10 %	100 µl
Acrylamid-Bis 40 %	1,33 ml
TEMED	5 µl
Ammoniumpersulfat 10 %	50 µl
dH <sub>2</sub> O	6 ml

Trenngel, 12,5 %

Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	2,5 ml
SDS 10 %	100 µl
Acrylamid-Bis 40 %	4 ml
TEMED	5 µl
Ammoniumpersulfat 10 %	50 µl
dH <sub>2</sub> O	3,35 ml

Acrylamid-Bis (19:1), 40 % (W/V)

Serva, Heidelberg

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)

Serva, Heidelberg

Sodium-Dodecylsulfate (SDS)

Serva, Heidelberg

Laufpuffer 5x

Tris Base	15 g
Glycin	72 g
SDS	5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Laufpuffer 1x

Laufpuffer 5x	200 ml
dH <sub>2</sub> O	800 ml

Blotting-Puffer 10x

Tris-Base	15 g
Glycerol	72 g
dH <sub>2</sub> O	ad 500 ml

Blotting-Puffer 1x

Blotting 10x	80 ml
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	720 ml

Blocking-Puffer

Odyssey Blocking Buffer	50 %
PBS	50 %

Li-Cor, Homburg

Antikörperinkubationslösung

Odyssey Blocking Buffer	50 %
PBS	50 %
Tween	0,1 %

Li-Cor, Homburg

Sigma, Deisenhofen

Waschpuffer

PBS mit 0,1 % Tween, letztes Waschen vor Detektion	PBS ohne Tween
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

Spektralphotometer Uvicon UV 860

Kontron, München

Mini-Protean 3 Cell

Bio-Rad, München

Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell

Bio-Rad, München

Electrophoresis Power Supply EPS600

Pharmacia Biotech,  
Hamburg

Odyssey Infrared Imaging System + Software R 1.0

Li-Cor, Homburg

Kultur- und Reaktionsgefäße

BD Discovery Labware,  
Heidelberg

## 2.8 Phasenkontrast-, Fluoreszenz- und Konfokalmikroskopie

### Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie

Olympus IMT-2, Inverses Forschungsmikroskop,	Olympus, Hamburg
Olympus IMT-2-RFA/340 und BH2-RFL,	Olympus, Hamburg
Fluoreszenzeinheit für Olympus IMT-2	Olympus, Hamburg
Fluoreszenzfilter:	
Anregung: BP 490 nm,	
Strahlenteiler (Dichromatischer Spiegel): 500 nm,	
Emission: LP 515 nm	

### Fotografie und Filmmaterial

Olympus OM-4, Spiegelreflexkamera	Olympus, Hamburg
Kodak Farbdiafilm für Tageslicht EC,	Kodak, Stuttgart
Empfindlichkeit DIN 21°	

### Konfokalmikroskopie

#### Reagenz zur Anfärbung von F-Aktin:

Alexa Fluor 546 phalloidin Kat.-Nr. A22283	Mobitec, Göttingen
--	--------------------

Paraformaldehydlösung 2 % wie unter  
Flusszytometrie

Triton X 100	Sigma, Deisenhofen
Triton X 100 1 % Arbeitslösung in PBS-/-	

Permafluor	BC Immunotech, Krefeld
Zeiss Axioskop2 LSM5 Pascal, Konfokalmikroskop	Zeiss, Berlin

## 2.9 Spezielle Software und Statistik

Zur Darstellung der Aminosäuresequenzen in Abb. 3 wurde die Software SeqVu, Garvan Institute of Medical Research, Sydney, Australien verwandt. Die Vektorkarten in Abb. 6 – 8 wurden mit der Software Macplasmmap, CGC Scientific, Ballwin, USA erstellt.

Die Software Prism, GraphPad Software, San Diego, USA wurde verwandt für die Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichung der Mittelwerte und die Signifikanzprüfung, die als Einwegvarianzanalyse für unverbundene Stichproben durchgeführt wurde.



### 3 Methoden

#### 3.1 Transformation, Bakterienkultur und Präparation von Plasmid-DNA

Die Gewinnung von Plasmid-DNA für die Transfektion in eukaryote Zellen erfolgt durch Präparation plasmidtragender *E. coli*. Für die Präparation der Plasmid-DNA werden die kompetenten *E. coli* zunächst mit dem jeweiligen Plasmid transformiert und dann durch Kultivierung vermehrt, wobei sie das übertragene Plasmid gemeinsam mit ihrem eigenen Genom replizieren. Die Expression eines Antibiotikaresistenzgens, das den transformierten prokaryoten Zellen Resistenz gegen ein dem Kulturmedium zugegebenes Antibiotikum verleiht, ermöglicht eine alleinige Proliferation plasmidtragender Bakterien.

##### 3.1.1 Transformation

Ein Aliquot der kompetenten *E. coli* wurde auf Eis getaut und mit 0,7 µl 25 mM β-Mercaptoethanol gemischt, um die Aufnahmefähigkeit der Bakterien für die Plasmid-DNA zu erhöhen, und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 0,5 µg Plasmid-DNA zu den zu transfizierenden Zellen gegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Wasserbad bei 42°C für 45 s einem Hitzepuls ausgesetzt und danach sofort wieder auf Eis gekühlt. Nach 2 min wurden 450 µl auf 37°C erwärmtes SOC-Medium zugegeben, und die Zellsuspension wurde für eine Stunde bei 37°C auf dem Schüttler bei 250 rpm inkubiert. Danach wurden je 50 µl der Zellsuspension auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Transformation mit Plasmid-DNA waren am nächsten Tag auf der Agarplatte mehr als 100 Einzelkolonien gewachsen. Wurden die Bakterien mit einem Ligationsansatz transformiert, waren am nächsten Tag auf der Agarplatte 0 bis 5 Kolonien gewachsen.

##### 3.1.2 Bakterienkultur

Die hier verwendeten Plasmide enthalten entweder ein Resistenzgen gegen Ampicillin oder ein Resistenzgen gegen Kanamycin.

Transformierte *E. coli* wurden in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) bei 37°C unter Schütteln mit 250 rpm in Kulturkolben kultiviert, wobei dem LB-Medium je nach Antibiotikaresistenz des transformierenden Plasmids 50 µg/ml Ampicillin

(pRK5-Plasmide, pGL3.BG.6κB, pRSVβ-Gal) oder 30 µg/ml Kanamycin (pIRES2-EGFP) zugesetzt wurde. Für eine Minipräparation wurde eine Kolonie in 10 ml, für eine Midipräparation in 90 ml überimpft und jeweils über Nacht inkubiert.

### 3.1.3 Plasmidpräparation

Die Minipräparation wurde nach dem Prinzip der Alkalischen Lyse durchgeführt, indem 1,8 ml Bakterienkultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt wurden, die Bakterien durch Zentrifugation bei 10000 g für 5 min pelletiert wurden, das Zellpellet in 150 µl Lösung I resuspendiert und die Lyse durch Zugabe von 150 µl Lösung II und Mischen initiiert wurde. Nach 30 s Inkubation wurden durch Zugabe von 150 µl Lösung III unerwünschte Zellbestandteile zusammen mit Kalium-SDS ausgefällt und durch Zentrifugation bei 10000 g für 5 min pelletiert. Der klare Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1 ml Ethanol gemischt und bei 15000 g, 4°C für 15 min zentrifugiert. Das gewonnene DNA/RNA-Pellet wurde getrocknet, in 100 µl RNase-Wasser resuspendiert, und die DNA konnte nach Übernachtinkubation weiterverarbeitet werden.

Die Midipräparation wurde mit dem Qiagen HighSpeed Midi Kit durchgeführt. 90 ml Bakteriensuspension wurden durch Zentrifugation bei 4500 g für 15 min pelletiert, und das Pellet wurde mit den Puffern des HighSpeed Midi Kits entsprechend den Anweisungen des Herstellers weiterverarbeitet. Es konnten pro Präparation eines Ansatzes von 90 ml ca. 250 µg Plasmid-DNA aufgereinigt werden. Die Konzentration der DNA wurde spektrophotometrisch anhand der Absorption bei 260 nm bestimmt.

## 3.2 Subklonierung der Genvarianten aus pRK5 in pIRES2-EGFP

Die für negative Mutanten von RhoA, Rac1 und Cdc42 codierenden Gene wurden aus dem Vektor pRK5 ausgeschnitten und in die multiple cloning site (MCS) des bicistronischen Expressionsvektors pIRES2-EGFP eingefügt. Da die MCS des Vektors pRK5 keine Sequenzen enthielt, um die Gene mit für die MCS des Vektors pIRES2-EGFP passenden beidseitig überhängenden Enden auszuschneiden, wurden die Inserts und der Vektor pIRES2-EGFP so bearbeitet, dass die Inserts an ihrem 3'-5'-Ende glatt (blunt-ended) und an ihrem 5'-3'-Ende überhängend (sticky-ended) in den Vektor pIRES2-EGFP eingefügt werden konnten.

Dazu wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

Aufschneiden von Vektor pRK5 mit der Restriktionsendonuklease *Cla* I und von Vektor pIRES2-EGFP mit *Xho* I, anschließend Aufreinigen der DNA.

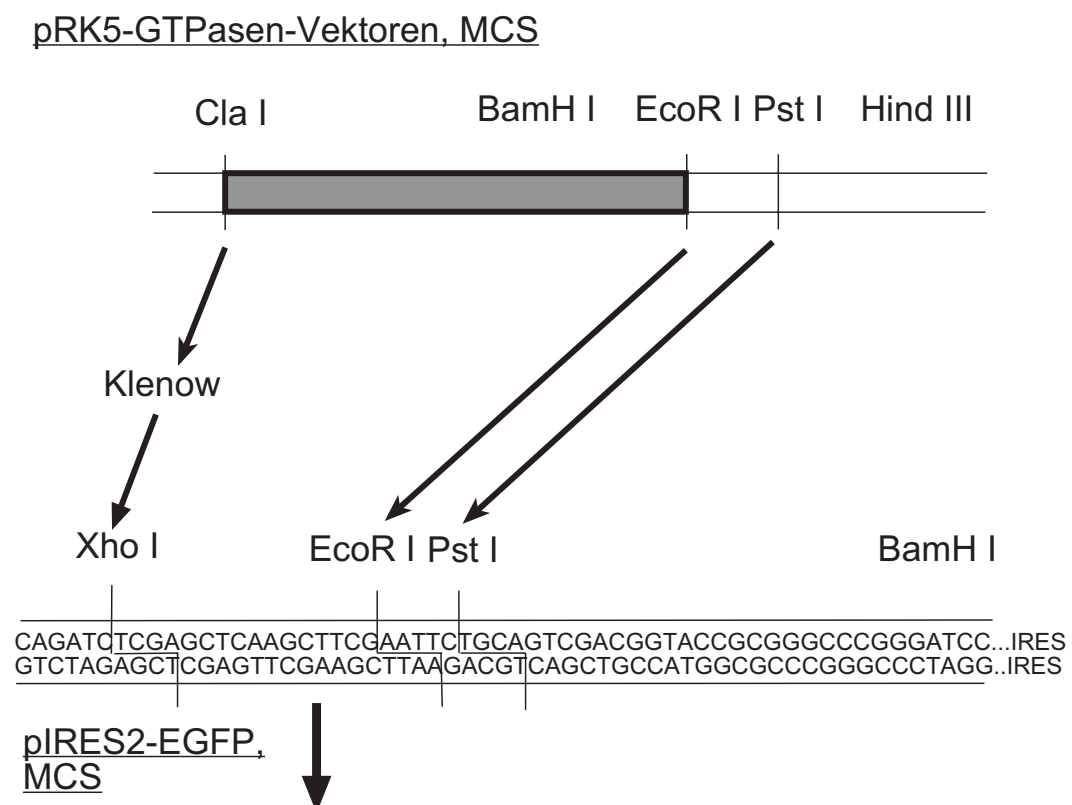
Auffüllen überhängender Enden in den Vektoren pRK5 und pIRES2-EGFP mit Klenow-Polymerase, anschließend Aufreinigen der DNA.

Ausschneiden des Inserts aus dem vorbehandelten Vektor pRK5 mit der Restriktionsendonuklease *Pst* I für RhoA und Rac1 bzw. mit *EcoR* I für Cdc42, korrespondierend dazu Schneiden des vorbehandelten Vektors pIRES2-EGFP mit *Pst* I oder *EcoR* I.

Auftrennung von Insert und pRK5-Vektorbackbone mittels Agarosegelelektrophorese und Gelelution der Insert-DNA, Aufreinigen der Vektor-DNA pIRES2-EGFP.

Ligation und Transformation der subklonierten Vektoren:

pRhoAN19-IRES-EGFP, pRac1N17-IRES-EGFP, pCdc42N17-IRES-EGFP



**Abb. 5: Subklonierung der inaktiven Mutanten in pIRES2-EGFP**

Zunächst wurden beide Vektoren im jeweils aufzufüllenden Sequenzabschnitt geschnitten und mit Klenow-Polymerase die Enden aufgefüllt. Dann wurden mit gleichen Schnittenzymen die überhängenden Enden generiert und Insert und Vektorbackbone ligiert.

### 3.2.1 Spezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen schneiden sequenzspezifisch doppelsträngige DNA, indem sie die hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindung innerhalb der für sie spezifischen Nukleotidsequenz katalysieren. 1 Einheit Enzym ist definiert als die Menge, die 1 µg DNA in einer Stunde unter optimalen Bedingungen schneidet. Die DNA wurde mit 2-3fachem Überschuss an Enzym in einem Volumen von 20 µl des mitgelieferten Puffers bei 37°C für 2 h inkubiert. In dieser Arbeit wurden die Enzyme *Cla* I, *Pst* I und *EcoR* I genutzt, um die für RhoA, Rac1 und Cdc42 codierenden Nukleotidsequenzen aus dem Vektor pRK5 auszuschneiden und den Vektor pIRES2-EGFP für das Einfügen der genannten Gene aufzuschneiden. Es wurden jeweils 10 µg DNA in einem Reaktionsansatz geschnitten, wobei für die spätere Insert-DNA insgesamt 20 µg DNA des jeweiligen pRK5-Vektors verarbeitet wurden, um nach den zahlreichen Arbeitsschritten genügend Insert-DNA für die Ligation zu erhalten.

#### Reaktionsansatz für die Restriktionshydrolyse:

Puffer, korrespondierend zum Enzym	10x
BSA, acetyliert	1 mg/ml
DNA	10 µg
Enzym	30 Units
dH2O	ad 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C für 2 h inkubiert.

### 3.2.2 Aufreinigen von DNA aus enzymatischen Reaktionen

Zum Aufreinigen von DNA aus Ansätzen zur Restriktionshydrolyse und aus Ansätzen zum Auffüllen von 5'-Enden mit Klenow-Polymerase wurde der Qiagen MiniElute Reaction Cleanup Kit verwandt. Der Kit basiert auf dem Prinzip der Adhäsion von DNA an eine Silikamembran in Anwesenheit chaotroper Reagenzien. Die Reaktionsansätze wurden auf eine Säule, deren zentraler Bestandteil die genannte Silikamembran war, gegeben und die DNA entsprechend den Anweisungen des Herstellers nach Waschen mit den mitgelieferten Puffern mit 10 µl Tris-Puffer für 1 min bei 10000 g in einer Tischzentrifuge eluiert. Je ein Ansatz zur Restriktionshydrolyse von 10 µg Plasmid-DNA wurde über zwei Säulen des Kits aufgereinigt. Je ein Ansatz zum Begradigen von überhängenden 5'-Enden wurde über eine Säule des Kits aufgereinigt.

### 3.2.3 Auffüllen überhängender 5'-DNA-Enden mit Klenow-Polymerase

Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I besitzt eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und eine 5'-3'-Endonuklease-Aktivität, dem Klenow-Fragment fehlt die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der vollständigen DNA-Polymerase I. In der vorliegenden Arbeit wurde die Klenow-Polymerase zum Auffüllen von überhängenden 5'-Enden mit unmarkierten Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) nach Spaltung der Vektoren pRK5-RhoAN19, pRK5-Rac1N17 und pRK5-Cd42N17 mit der Restriktionsendonuklease *Cla*I verwandt. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz in 20 µl Gesamtvolumen hergestellt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 75°C für 10 min inaktiviert:

<u>Reagenz:</u>	<u>Menge</u>	<u>Volumen</u>
Klenow-Puffer, 10x		2 µl
DNA	4 µg	8,6 µl
BSA, 10x	20 µg/ml	2 µl
dNTP-Stock, 5x	40 µM	4 µl
Klenow-Polymerase	4 u	0,8 µl
dH <sub>2</sub> O		ad 20 µl

### 3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente wurden Agarosegele verwandt. Ein 1% Agarosegel wurde hergestellt, indem 5 ml 20 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) mit 95 ml dH<sub>2</sub>O und 1 g Agarose gemischt, die Suspension kurz aufgekocht und 5 µl 1% Ethidiumbromidlösung zugegeben wurde. Die Lösung wurde in eine Horizontalgelkammer gegossen, und nach Aushärten des Gels wurde der jeweilige Ansatz zur Restriktionshydrolyse mit 8 µl Auftragepuffer versetzt und in zwei Taschen des 1% Agarosegels aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwandt, und die DNA-Fragmente wurden bei einer Spannung von 80 V aufgetrennt.

### 3.2.5 Elution elektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente aus Agarosegelen

Zur Elution elektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde der QIAquick Gel Extraction Kit verwendet. Die entsprechende DNA-Bande wurde unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Das der Aufreinigung zugrunde liegende Prinzip ist unter 3.2.2 beschrieben. Das Gelstück wurde mit den mitgelieferten Puffern

entsprechend den Angaben des Herstellers bearbeitet und die DNA mit 30 µl Tris-Puffer bei 10.000 g für 1 min in einer Tischzentrifuge eluiert.

### 3.2.6 Ligation von einseitig glatt beendeten DNA-Fragmenten und Transformation

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen der 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppe zweier DNA-Fragmente. Das Enzym katalysiert sowohl die Verbindung glatter Enden als auch die Verbindung überhängender Enden, wobei die Verbindung glatter Enden mehr Zeit erfordert. Neben der Zeit ist das molare Verhältnis zwischen Vektor-DNA und Insert-DNA wesentlich für eine erfolgreiche Ligation. Daneben sollte das Reaktionsvolumen eine Größe von 20 µl nicht übersteigen. Für jedes neu zu ligierende Plasmid wurden zwei Ligationsansätze mit 15 µl und 20 µl Gesamtvolumen hergestellt, um das passende molare Verhältnis zu erhalten. Es wurden je 100 ng Vektor-DNA und variable Mengen an Insert-DNA in molarem Überschuss eingesetzt:

Vektor-DNA	100 ng
Insert-DNA	4-10-facher molarer Überschuss
Rapid Ligation Buffer, 2x	7,5 µl/10 µl
T4 DNA Ligase	3 u
dH <sub>2</sub> O	ad 15 µl/20 µl

Die Ligationsansätze wurde entsprechend den Herstellerangaben für das LigaFast-System bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert und dann wie unter 3.1.1 beschrieben transformiert.

### 3.2.7 Identifizierung geeigneter Subklone und DNA-Sequenzierung

Von den Agarplatten, auf denen die mit einem Ligationsansatz transformierten *E. coli* kultiviert wurden, wurden pro Ligationsansatz 10 Kolonien gepickt und wie unter 3.1.3 beschrieben nach Inkubation eine Minipräparation durchgeführt. Die präparierte Plasmid-DNA wurde einer Restriktionshydrolyse mit dem Enzym *BamH I* entsprechend 3.2.1 unterzogen, und die DNA-Fragmente wurden entsprechend 3.2.4 im Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt, um eine erfolgreiche Subklonierung des jeweiligen Gens in den Vektor pIRES2-EGFP zu überprüfen. Unter den 10 überprüften Kolonien fanden sich je nach subkloniertem Gen 1 bis 5, in deren Plasmid-DNA das Insert durch Ausschneiden mit *BamH I*

nachgewiesen wurde. DNA aus einem solchen Klon wurde für alle drei subklonierten Gene von der Firma Qiagen, Hilden sequenziert, um die jeweilige Gensequenz und ihre das Protein inaktivierende Mutation zu überprüfen.

### **3.3 Zellkultur**

Beide benutzten Zelllinien wurden in T75-Zellkulturflaschen jeweils mit 20 ml Kulturmedium bei 37°C und 0,5 % CO<sub>2</sub> bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Wenn Zellen für Experimente ausplattiert wurden, wurde zunächst unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer die Anzahl an Zellen pro ml in der Zellsuspension bestimmt und dann die definierte Anzahl an Zellen ausplattiert.

#### **3.3.1 Zellkultur der humanen mikrovaskulären Endothelzelllinie HPMEC-ST1.6R**

Alle Kulturgefäße wurden mit Gelatinelösung für 30 min vorbehandelt, um den Zellen verbesserte Adhäsionsmöglichkeiten zu bieten. Dem unter 2.3 beschriebenen Endothelzellmedium wurde 50 µg/ml Geneticin (G418) zugesetzt. Das Medium wurde alle 2–3 Tage ausgetauscht. Die Zellen wurden bis zur Bildung eines Monolayers kultiviert und dann im Verhältnis 1 : 3 gesplittet. Zum Splitten wurden die Zellen 1x mit 10 ml PBS -/- gespült, mit 3 ml Trypsin für 1/2 min inkubiert und dann durch Klopfen restlos abgelöst. Die enzymatische Aktivität des Trypsin wurde durch Zugabe von 10 ml Endothelzellmedium gestoppt und die Zellsuspension für 6 min bei 680 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3 ml Endothelzellmedium resuspendiert und die Zellen wurden ausplattiert. Für Experimente ausplattierte Zellen wurden in einem Gemisch aus 50 % des unter Materialien beschriebenen Endothelzellmediums und 50 % des Endothelial Cell Growth Medium ohne Zusatz von G418 kultiviert.

#### **3.3.2 Zellkultur der LPS-reagiblen Reporterzelllinie CHO-3E10**

Zellen der Linie CHO-3E10 wurden in T75-Kulturflaschen mit 20 ml des unter 2.3 beschriebenen CHO-Kulturmediums bei 37°C und 0,5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Dem CHO-Zellmedium wurden 400 µg/ml Hygromycin zugesetzt. Das Medium wurde nach 4 Tagen ausgetauscht. Nach spätestens 7 Tagen wurden die konfluenten Zellen passagiert. Dazu wurden die Zellen 1x mit 10 ml PBS-/- gespült und anschließend mit 3 ml Trypsin für 3–5 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Beklopfen der Kulturflasche wurden die Zellen gänzlich abgelöst und die enzymatische Aktivität

des Trypsin mit 10 ml CHO-Kulturmedium abgestoppt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 680 g für 6 min pelletiert und das Pellet in 3 ml CHO-Kulturmedium resuspendiert. Davon wurden 100 µl in einer neuen T75 subkultiviert.

### **3.4 Transfektion und transiente Überexpression inaktiver Genvarianten**

Alle Zellen, die später in die Messung eingingen, wurden mit gleichen Mengen an Plasmid-DNA unter Verwendung gleicher Mengen an Transfektionsreagenzien transfiziert. In Ansätzen für Zellen, die später als Negativ- und Positivkontrollen dienten, wurde die für kleine GTP-bindende Proteine codierende Plasmid-DNA mit DNA des Leervektors pRK5 bzw. für CHO-Zellen mit dem Vektor pIRES2-EGFP ersetzt.

#### **3.4.1 Transfektion humaner Endothelzellen mit dem Transfektionsreagenz Superfect**

Endothelzellen wurden in subkonfluentem bis konfluentem Zustand zwei Tage nach Ausplattieren von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer Sechsllochplatte in 3 ml Endothelzellwachstumsmedium transfiziert. Pro Vertiefung einer Sechsllochplatte wurden 3 µg DNA und 10 µl Superfect eingesetzt: In einem 2-ml-Reaktionsgefäß wurden 3 µg Plasmid-DNA in 100 µl zusatzfreiem Medium 199 verdünnt, 10 µl Superfect hinzugefügt, das Gemisch 5 s gevortext und 10 min inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen 1 x mit 3 ml PBS+/+ pro Vertiefung gewaschen, und dann wurden 600 µl Endothelzellkulturmedium auf eine Vertiefung einer Sechsllochplatte gegeben. Das Superfect-DNA Gemisch wurde zu den 600 µl Kulturmedium gegeben, und die Zellen wurden für 4 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit 3 ml PBS+/+ gewaschen und mit 4 ml Endothelzellkulturmedium pro Vertiefung weiter inkubiert.

#### **3.4.2 Transfektion von CHO-3E10-Zellen mit dem Transfektionsreagenz Effectene**

Die Transfektion von CHO-3E10 erfolgte in Sechsllochplatten. Die Zellen wurden in subkonfluentem Zustand am 2. Tag nach Ausplattieren von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung in 3 ml CHO-Wachstumsmedium transfiziert. Pro Vertiefung einer Sechsllochplatte wurden 0,75 µg DNA, 6 µl Enhancer und 10 µl Effectenereagenz eingesetzt: In einem 2-ml-Reaktionsgefäß wurden die 0,75 µg DNA in 100 µl des



zum Kit gehörenden Puffers EC verdünnt und 6 µl Enhancer zugegeben, das Gemisch wurde 2 s gevortext und 5 min inkubiert, dann wurden 10 µl Effectene zugegeben, das Gemisch 10 s gevortext und 10 min inkubiert. Während der Inkubation wurden die Zellen 1 x mit 3 ml PBS+/+ pro Vertiefung gewaschen, und anschließend wurde 1 ml CHO-Kulturmedium in eine Vertiefung einer Sechsllochplatte gegeben. Dann wurde das DNA-Effectene Gemisch zu dem 1 ml Kulturmedium gegeben und die Zellen wurden für 2,5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 3 ml PBS+/+ wurden die Zellen mit 3 ml Wachstumsmedium pro Vertiefung wieder inkubiert.

Die erfolgreiche Transfektion wurde am nächsten Tag sowohl für Endothel- als auch für CHO-Zellen anhand der Fluoreszenz GFP-transfizierter Zellen unter dem Olympus IMT-2 Mikroskop mit einem für FITC gebräuchlichen Filterset überprüft. Die Effizienz, gemessen an GFP-positiven Zellen, einen Tag nach Transfektion entsprechend obiger Beschreibung lag für Endothelzellen in der Größenordnung 3–5 % und für CHO-Zellen in der Größenordnung 20 %.

### **3.5 GFP-assozierte selektive durchflusszytometrische Messung**

Die Durchflusszytometrie, auch als fluorescence-aided cell sorting (FACS) bezeichnet, bestimmt für eine Population von in einem kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom durch eine Flusszelle geführten Zellen verschiedene Parameter. Das sind neben den Standardparametern Größe und Granularität je nach Gerät eine Reihe weiterer Fluoreszenzparameter für jede einzelne Zelle. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgt nach Anregung durch einen Laser und Aufspaltung des emittierten Lichts mittels optischer Filtereinheiten durch Photomultipliertubes, in denen ein der Lichtintensität korrelierendes elektrisches Signal induziert wird. Nach Verarbeitung durch einen Rechner werden die gemessenen Fluoreszenzen als Dot Plot oder Histogramm dargestellt. Die vorhergehende Markierung zu detektierender zellulärer Antigene mit fluoreszenzkonjugierten Antikörpern ermöglicht die qualitative und quantitative Bestimmung dieser Antigene. In dieser Arbeit wurde neben den antikörpermarkierten Zielantigenen IL-8/CXCL8 und CD25-Reportermolekül auch von den transfizierten Zellen exprimiertes Grünes Fluoreszenzprotein (GFP) detektiert. Das für das GFP codierende Gen als Marker der erfolgreichen Transfektion wurde gemeinsam mit dem zu untersuchenden Gen von Interesse in die Zelle transferiert. Wesentlich ist, dass die eingesetzten Fluoreszenzmoleküle auf die optische Ausstattung des Flusszytometers

abgestimmt sind. Das für diese Arbeit verwendete BD FacsCalibur regt die Zellen mit zwei Lasern bei 488 nm und 635 nm an, wobei das exprimierte GFP bei 488 nm angeregt wird und die beiden eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe Allophycocyanin (APC) und Cyanin-5 (Cy5) bei 635 nm. Die Auswahl der verwendeten Detektionskanäle und Farbstoffe wird unter 5.2.3 diskutiert.

### 3.5.1 Selektive Bestimmung von intrazellulärem IL-8/CXCL8 in transfizierten Endothelzellen

Unter Verwendung des BD FacsCalibur und der Software Cell Quest Pro wurden für jede einzelne Zelle neben den Standardparametern Größe und Granularität die Fluoreszenzen im Kanal Fluoreszenz-1 (FI-1) bei 530 nm mit einer Bandbreite von 30 nm und im Kanal FI-4 bei 661 nm mit einer Bandbreite von 16 nm bestimmt. Anhand der Fluoreszenz in FI-1 wurden, nachdem die Eigenfluoreszenz der Endothelzellen mit einer nicht transfizierten Population bestimmt wurde, die transfizierten GFP-positiven Zellen identifiziert. Im Kanal FI-4 wurde nach intrazellulärem Färben die IL-8/CXCL8-assoziierte durch Cy5 verursachte Fluoreszenz als Maß für die Expression von IL-8/CXCL8 quantifiziert, wobei die intrazelluläre Zytokinbestimmung nach der Methode von Jung erfolgte [Jung et al., 1993]. Dieses Vorgehen ermöglicht die selektive Messung der IL-8/CXCL8-Expression in transfizierten Zellen und erlaubt damit eine Aussage über die getesteten Mutanten der GTP-bindenden Proteine, obwohl die Transfektionseffizienz der schwer transfizierbaren Endothelzellen in einer Größenordnung  $< 5\%$  liegt.

Zur Messung des intrazellulären IL-8/CXCL8 wurden die Kulturen der Linie HPMEC-ST1.6R nach folgendem zeitlichen Verlauf bearbeitet:

#### Tag 0: Ausplattieren der Endothelzellen

Endothelzellen, die in einer T75 einen Monolayer bildeten, wurden, wie unter 3.3.1 beschrieben, abtrypsiniert, die Zellzahl unter Verwendung der Neubauer-Zählkammer bestimmt und  $2 \times 10^5$  Zellen in 3 ml Endothelzellwachstumsmedium pro Vertiefung einer Sechsllochplatte ausplattiert. Für jeweils einen späteren Messwert wurde eine Sechsllochplatte ausplattiert.

Tag 1: Kotransfektion der Zellen mit den zu testenden Genvarianten in pRK5 und pGreenLantern1 unter Verwendung des Transfektionsreagens Superfect

Die Endothelzellen wurden mit den Plasmiden pRK5-Leer, pRK5-RhoAN19, pRK5-Rac1N17, pRK5-Cdc42N17 und pGreenLantern1 kotransfiziert. Die Transfektion von insgesamt 3 µg DNA pro Vertiefung erfolgte mit pRK5-Plasmid und pGreenLantern1 im Verhältnis 1 : 1 entsprechend der unter 3.6 beschriebenen Methode. Zellen, die später als Negativ-, Positiv- und Isotypenkontrolle dienten, wurden mit dem Plasmid pRK5-Leer und pGreenLantern1 transfiziert.

Tag 3: Stimulieren mit 150 ng/ml LPS und Inhibition der Zytokinausschleusung mit 2 µM Monensin, 8 h später Ablösen, Fixieren, Färben der Endothelzellen und flusszytometrische Bestimmung des intrazellulären IL-8/CXCL8

Die LPS-induzierte IL-8/CXCL8-Sekretion von primären Endothelzellen aus der Nabelschnurvene ist 4–8 Stunden nach Expositionsbeginn maximal [Hippenstiel et al., 2000]. Die Stimulation der in dieser Arbeit verwendeten mikrovaskulären Endothelzellen erfolgte daher für 8 h, wobei 4 h nach Expositionsbeginn dem Kulturmedium Monensin in einer Konzentration von 2 µM zugegeben wurde. Dieses bewirkt eine Akkumulation exprimierter Zytokine im Golgiapparat. In 2 ml Endothelzellkulturmedium pro Vertiefung wurde mit einer Konzentration von 150 ng/ml LPS von *E. coli* stimuliert, wozu 10 µl der unter 2.5 beschriebenen LPS-Stocklösung in 990 µl PBS+/+ verdünnt wurden und von diesem Substock 30 µl pro Vertiefung zugegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen nach Waschen mit PBS-/– mit 0,5 ml Accutase pro Vertiefung abgelöst, in 3 ml Medium aufgenommen und durch Zentrifugation bei 680 g für 8 min pelletiert. Nach jedem der folgenden Arbeitsschritte wurden die Zellen mit 4 ml PBS-/– gewaschen und auf die gleiche Weise für den nächsten Arbeitsschritt pelletiert. Nach dem ersten Pelletieren wurden die Zellen einer Sechslachplatte für die weitere Verarbeitung in einem Facsröhrchen zusammengeführt. Die Zellen wurden dann durch Resuspension in 0,5 ml 2 % Paraformaldehydlösung für 10 min fixiert und anschließend durch Resuspension in 0,5 ml 0,1 % Saponinlösung für 10 min permeabilisiert. Zur Inkubation mit dem primären Antikörper (Ak) gegen IL-8/CXCL8 bzw. dem Isotypenkontroll-Ak wurden die Zellen in 20 µl Octagam resuspendiert, dann 0,75 µg Ak zugegeben und für 30 min inkubiert. Die Inkubation mit dem sekundären Cy5-gelabelten Antikörper erfolgte mit 0,4 µg Antikörper in 50 µl 0,1% Saponinlösung für 30 min. Nach Waschen wurden die

Zellen in 1ml PBS-/- resuspendiert und im BD Facscalibur gemessen.

### 3.5.2 Selektive Bestimmung der Reporter-Aktivierung in transfizierten CHO-3E10-Zellen

Die Zellen der Linie CHO-3E10 sind aus einem mit den beiden Plasmiden pUMS(ELAM)-Tac und pCEP4/CD14 stabil kotransfiziertem Klon hervorgegangen [Delude et al., 1998]. pUMS(ELAM)-Tac codiert für das humane Zelloberflächenantigen CD25, das in diesem Vektor unter der Kontrolle eines NF- $\kappa$ B-abhängigen Promotors steht. Die Verstärkerregion enthält daneben ein cis-reaktives Element für AP-1 [Jensen und Whitehead, 2003; Whitley et al., 1994]. Die Expression von CD14 macht die Zellen reagibel gegen die Exposition mit LPS. Flusszytometrisch wurden entsprechend der unter 3.5 beschriebenen Methode mit den Plasmiden pRhoAN19-IRES-EGFP, pRac1N17-IRES-EGFP und pCdc42N17-IRES-EGFP transfizierte Zellen durch ihre Fluoreszenz in FI-1 identifiziert, und anhand des Signals in Kanal FI-4 wurde die durch Allophycocyanin verursachte CD25-assoziierte Fluoreszenz als Maß für die Reporter-Aktivierung quantifiziert.

Zur Messung der LPS-induzierten Reporter-Aktivierung wurden die Kulturen der Linie CHO-3E10 nach folgendem zeitlichem Verlauf bearbeitet:

Tag 0: Ausplattieren der CHO-3E10-Zellen

CHO-3E10-Zellen, die sich in einer T75 in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden wie unter 3.3.2 beschrieben abtrypsiniert, die Zellzahl unter Verwendung der Neubauer-Zählkammer bestimmt und  $2 \times 10^5$  Zellen in 3 ml CHO-Wachstumsmedium pro Vertiefung einer Sechsllochplatte ausplattiert. Für jeweils einen Messwert wurden 2 Vertiefungen einer Sechsllochplatte ausplattiert.

Tag 2: Transfektion mit den zu testenden Genvarianten unter Verwendung von Effectene

Die subkonfluenten Zellen wurden wie 3.4.2 beschrieben mit den Plasmiden pRhoAN19-IRES-EGFP, pRac1N17-IRES-EGFP und pCdc42N17-IRES-EGFP transfiziert. Zellen, die später als Negativ-, Positiv- und Isotypenkontrolle dienten, wurden mit dem Plasmid pIRES2-EGFP transfiziert.

---

Tag 3: Mindestens 24 h nach Transfektion Stimulation der Zellen mit 150 ng/ml LPS

Die Stimulation der Zellen erfolgte in 2 ml CHO-Kulturmedium pro Vertiefung mit einer Konzentration von 150 ng/ml LPS von *E. coli* über eine Zeit von 18 h. Dazu wurden 10 µl der unter 2.5 beschriebenen LPS-Stocklösung in 990 µl PBS+/+ verdünnt und von diesem Substock 30 µl auf 2 ml Kulturmedium in einer Vertiefung gegeben.

Tag 4: 18 h nach Stimulation Ablösen, Färben und flusszytometrische Bestimmung der CD25-Expression als Maß für die Reporter-Aktivierung

Um die Oberflächenantigene der CHO-Zellen zu schonen, wurden die Zellen nicht fixiert, sondern nativ mit den Antikörpern inkubiert und gemessen. Nach dem Ablösen der Zellen mit Accutase erfolgten alle weiteren Schritte der Verarbeitung bis zum Messen der Zellen auf Eis, um den Stoffwechsel der nativen Zellen zu minimieren. Die Zellen wurden mit 2 ml PBS-/– pro Vertiefung gewaschen und anschließend mit 0,5 ml Accutase für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen restlos abgelöst. Nach Zugabe von 3 ml Kulturmedium pro Vertiefung wurde die Zellsuspension aus jeweils einer Vertiefung in ein Facsröhrchen überführt und wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 680 g für 8 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml PBS-/– resuspendiert und die Zellsuspensionen aus jeweils zwei gleich behandelten Vertiefungen in einem Facsröhrchen zusammengeführt und gemeinsam weiterverarbeitet. Die Zellsuspensionen wurden erneut wie oben beschrieben durch Zentrifugation pelletiert. Die Zellpellets wurden in 20 µl 1 % Octagamlösung resuspendiert und Negativ-, Positivkontrolle sowie die RhoAN19-, Rac1N17- und Cdc42N17-transfizierten Zellen mit jeweils 5 µl des Anti-CD25-APC-Antikörpers, die Zellen der Isotypenkontrolle mit 5 µl des mouse-gamma1-APC-Antikörpers für 30 Minuten inkubiert. Nach 30 Minuten wurden die Röhrchen mit den Zell-Antikörper-Suspensionen mit 4 ml PBS-/– aufgefüllt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Zum Waschen der Zellen von nicht gebundenem Antikörper wurden die Zellpellets erneut in PBS-/– resuspendiert und zentrifugiert. Die dann gewonnenen Zellpellets wurden in 1 ml PBS-/– resuspendiert und im BD Facscalibur gemessen.

### 3.6 Luziferasebiolumineszenzassay zur Bestimmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B

Der Luziferasebiolumineszenzassay wurde in dieser Arbeit als Methode zur Messung der Transkriptionsfaktoraktivierung unabhängig von speziellen Zielgenen eingesetzt.

Die Oxidation eines assoziierten Luziferins unter der katalytischen Aktivität einer Luziferase mit Lichtemission ist das Grundprinzip von Biolumineszenz, wobei Luziferase (Enzym) und Luziferin (Substrat) Oberbegriffe sind, unter denen je nach Organismus verschiedene Substanzen zusammengefasst werden [Chalfie und Kain, 1998]. Das im Vektor pGL3.BG.6 $\kappa$ B enthaltene Gen *luc+* codiert für eine zu Reporterzwecken optimierte Variante des Luziferasegens aus *Photinus pyralis* und steht unter der Kontrolle eines durch Anlagerung von NF- $\kappa$ B induzierbaren Promotors. Die von *luc+* codierte Luziferase wird also in mit pGL.BG.6 $\kappa$ B transfizierten Zellen in Abhängigkeit der Aktivierung von NF- $\kappa$ B exprimiert. Die enzymatische Aktivität des Proteinextrakts als Maß für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung verschieden behandelter Proben kann anhand der Lichtemission der Biolumineszenzreaktion im Luminometer quantifiziert werden. In diesem Versuch wurden die Endothelzellen mit pGL.BG.6 $\kappa$ B und den inaktiven Mutanten der GTP-bindenden Proteine kotransfiziert, um deren Wirkung auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu testen. Zusätzlich wurde das Plasmid RSV $\beta$ -Gal kotransfiziert, um Schwankungen in der Transfektionseffizienz durch Abgleich der Werte für die Luziferaselumineszenz auf die Werte für  $\beta$ -Galaktosidasechemielumineszenz zu normalisieren.

Zur Messung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B mittels Biolumineszenzassay wurden die Zellen unter Verwendung des Luciferase Assay System (Promega) und des  $\beta$ -Gal Assay (Roche) nach folgendem Verlauf bearbeitet:

Tag 0: Ausplattieren der Endothelzellen

Aus einer T75 wurden wie unter 3.1 beschrieben Zellen abtrypsiniert und  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer Sechsllochplatte in 3 ml Wachstumsmedium ausplattiert, wobei pro späteren Messwert 2 Vertiefungen Zellen angesetzt wurden.

### Tag 1: Transfektion der Zellen

Es wurde jeweils ein pRK5-Plasmid der für die inaktiven Varianten der GTP-bindenden Proteine codierenden pRK5-Plasmide mit pGL3.BG.6κB und pRSVβ-Gal im Verhältnis 50 : 25 : 25 mit einer Gesamtmenge von 2 µg DNA pro Vertiefung wie unter 3.4.1 beschrieben kotransfiziert.

Tag 2: Stimulieren der Zellen mit 150 ng/ml LPS, Proteingewinnung und Bestimmung der Luziferinbiolumineszenz als Maß für die Aktivierung von NF-κB sowie der β-Galaktosidaselumineszenz

Die Zellen wurden mit 150 ng/ml LPS von *E.coli* in 2 ml Kulturmedium über einen Zeitraum von 6 h stimuliert. Dann wurden die Zellen mit 400 µl Reporterassay-Lysepuffer pro Vertiefung lysiert, das Zellysate vollständig abgekratzt, in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt, dort 10 min inkubiert und anschließend wurden Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 10000 g für 10 min vom Proteinlysate getrennt. Von dem in ein neues Reaktionsgefäß überführten Proteinlysate wurden zur Messung der Luziferaseaktivität der Probe 5 µl zu 50 µl Luziferinsubstrat gegeben und die Lumineszenz für 5 s im Luminometer gemessen. Zur Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität derselben Probe wurden 50 µl Lysat auf 100 µl Substratreagenz aus dem β-Gal Reporter Gene Assay gegeben und nach 30 min 50 µl Initiationsreagenz zugegeben. Anschließend wurde die Chemielumineszenz der Probe im Luminometer bestimmt.

### 3.7 Selektion stabil transfizierter Zellen

Die Überexpression eines Proteins nach Transfektion einer Zellpopulation mit Plasmid-DNA ist in der ganz überwiegenden Zahl der transfizierten Zellen zeitlich auf wenige Tage bis Wochen beschränkt, wohingegen sehr wenige der Zellen das Protein dauerhaft exprimieren. Enthält der transfizierende Vektor neben dem Gen von Interesse zusätzlich ein Gen, das für ein Enzym codiert, welches ein für eukaryote Zellen toxisches Selektionsantibiotikum inaktiviert, ist die Selektion dieser stabil transfizierten Zellen möglich. Der Vektor pIRES2-EGFP und seine in dieser Arbeit hergestellten Derivate codieren unter anderem für ein Enzym aus der Gruppe der Aminoglykosid 3'-phosphotransferasen (APH(3')), die Aminoglykosidantibiotika inaktivieren können. Im Vektor geht dem Gen neben einem Promotor und Replikationsursprung für die Expression in *E. coli* zur Selektion transformierter Bakterien für die Plasmidpräparation auch ein Promotor

und Replikationsursprung für die Transkription in SV40-transformierten Zelllinien voraus. Damit ist die Selektion stabil transfizierter Zellen der Linie CHO-3E10 unter Verwendung des Aminoglykosids G418, das aufgrund seiner besonderen Affinität zum eukaryotischen Ribosom verwendet wird, möglich. Die Dosierung des Selektionsantibiotikums variiert in Abhängigkeit von Zelltyp und Kulturbedingungen.

In dieser Arbeit wurden Zellen wie unter 3.6.2 beschrieben transfiziert und die transfizierte Population nach drei Tagen Ruhezeit ohne Selektionsantibiotikum über zwei Wochen selektiert. Dazu wurde die Hälfte der Zellen aus einer Vertiefung einer Sechsllochplatte zunächst für 7 Tage in einer T75 in 10 ml Medium, dann für 7 Tage in 96-Loch-Platten in 100 µl Medium pro Vertiefung jeweils mit einer Konzentration von 5 mg/ml G418 in CHO-Zellkulturmedium kultiviert. Danach wurden die 96-Loch-Platten fluoreszenzmikroskopisch auf EGFP-positive Zellen untersucht und fluoreszierende Zellklone (ca. 1 EGFP-positiver Klon auf 500-1000 Vertiefungen) abtrypsiniert, in T25-Zellkulturflaschen überführt und dort mit einer Konzentration von 1 mg/ml G418 in 5 ml Medium weiterkultiviert.

### **3.8 Western-Blot**

Mit dem Western-Blot wird ein einzelnes Protein von Interesse in einem Proteingemisch, ggf. semiquantitativ, nachgewiesen. Die Proteine der Probe werden zunächst nach ihrer molaren Masse aufgetrennt, dann auf eine Membran übertragen, dort der Antikörperexposition ausgesetzt und dann, je nach eingesetztem Detektionssystem, hier über fluoreszenzkonjugierte Sekundärantikörper das Protein von Interesse nachgewiesen.

In dieser Arbeit wurde der Western-Blot zum Nachweis der mit dem Myc-Epitop markierten Proteine RhoAN19 und Cdc42N17 in den Proteinextrakten der neu generierten Zelllinien CHO-RhoAN19 und CHO-Cdc42N17 genutzt.

#### **3.8.1 Proteinextraktion**

Die Zellen zweier Vertiefungen einer Sechsllochplatte wurden auf Eis mit PBS gewaschen, mit je 30 µl Lysepuffer lysiert, das Lysat in 2-ml-Reaktionsgefäße überführt, für 5 min auf Eis inkubiert, bei 10000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert, der proteinhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach



Abnahme von 5 µl für die Proteinkonzentrationsbestimmung bei –20°C gelagert.

### 3.8.2 Konzentrationsbestimmung des Proteins im Lysat

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung unter Verwendung des Bio-Rad Bradford Proteinassays wurden je 995 µl des 1 : 5 verdünnten Farbstoffreagenz mit 5 µl Proteinlysate gemischt, nach 5 min Inkubation die Absorption der Probe bei 595 nm im Photometer gemessen und anhand einer mit BSA generierten Standardkurve die zugehörige Proteinkonzentration bestimmt.

### 3.8.3 Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenn- und Sammelgel wurden in einer Bio-Rad-Elektrophoresekammer angesetzt, indem die unter Material beschriebenen Reagenzien gemischt wurden und die Vernetzung mit TEMED angestoßen wurde. Während der Polymerisation des Gels wurden je Probe 80 µg Protein 1:1 mit β-Mercaptoethanol-haltigem Gelladepuffer versetzt, für 3 min unter Schütteln bei 95°C erhitzt und anschließend in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Für 15 min wurden die Proteine im Sammelgel zusammengeführt und anschließend bei 100 V im 12,5 % Trenngel bis zum Austritt des Ladepufferfarbstoffs aus dem Trenngel aufgetrennt.

### 3.8.4 Protein-Blot und Antikörperexposition

Das Blotsystem wurde in eiskaltem Blotpuffer eingelegt: zwei Blot pads, darauf je zwei Whatmann-Filterpapiere. Die Transfermembran wurde zunächst für 5 s in 100 % eiskaltem Methanol äquilibriert, dann in Blotting-Puffer eingelegt, dann auf das Filterpapier aufgebracht, das vom Sammelgel getrennte Trenngel auf die Membran gelegt, das luftblasenfrei verriegelte System in die Blotkammer eingesetzt und der Proteintransfer bei 100 V in eiskaltem Blotpuffer für 1 h durchgeführt. Nach dem Blot wurde die Membran für 2 h unter Schütteln in Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen an die Membran zu minimieren, dann erfolgte die Inkubation mit dem ersten monoklonalen Antikörper (Ak) gegen das Myc-Epitop, 1 : 600 verdünnt in Ak-Lösung über Nacht. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min in Waschlösung erfolgte die Inkubation mit dem zweiten IRDye800-konjugierten Ak gegen IgG-Maus 1 : 2000 verdünnt in Ak-Lösung. Nach erneutem dreimaligem Waschen, zuletzt mit Waschpuffer ohne Tween, erfolgte die Detektion.

### 3.8.5 Detektion des IRDye800-assoziierten Zielproteins mit dem Odyssey-Scanner

Grundlage des in dieser Arbeit eingesetzten Odyssey-Detektionssystems der Firma Licor ist die Detektion der Fluoreszenz bei 800 nm. Das detektierte Signal wird vom System digital gespeichert und kann dann mit der Odyssey-Software verarbeitet und in ein Bild umgesetzt werden. Vorteile gegenüber der klassischen Detektion mittels Enhanced Chemiluminescence (ECL) sind 1. variable Möglichkeiten das der Fluoreszenz entsprechende elektrische Signal zu verstärken, 2. digitale Speicherung des Ergebnisses, 3. ggf. Nachweis zweier verschiedener Proteine auf einer Membran durch Verwendung zwei verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, 4. kein Zeitdruck bei der Verarbeitung, da die Fluoreszenzfarbstoffe sich auch noch nach Tagen anregen lassen.

## 3.9 Phasenkontrast-, Fluoreszenz- und Konfokalmikroskopie

### 3.9.1 Phasenkontrastmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie

Die Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nativer Zellen wurden am inversen Mikroskop Olympus IMT-2 mit der Spiegelreflexkamera Olympus OM-4 angefertigt. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde eine für Fluoresceinisothiocyanat (FITC) optimierte Filtereinheit bestehend aus Anregungsfilter: BP 490 nm, Farbteiler (Dichromatischer Spiegel): 500 nm und Emissionsfilter: LP 515 nm verwendet. Die spektralen Eigenschaften FITC-geeigneter Filter erlauben auch die Darstellung der eingesetzten GFP-Varianten, denn beide Varianten enthalten die Mutation S65T, die ihr Anregungsmaximum in den Bereich von 490 nm verschiebt [Diamond und De Maggio, 2000]. Das Emissionsmaximum liegt im Bereich von 507 nm. Zellen für die transiente Transfektion und stabil transformierte Zelllinien wurden jeweils in Sechslachplatten ausplattiert. Für die Anfertigung Fluoreszenz-mikroskopischer Aufnahmen transient transfizierter Zellen der Linien HPMEC-ST1.6R und CHO-3E10 wurden die Zellen entsprechend 3.4 mit inaktiven GTPasen und die Kontrolle mit Leervektor transfiziert. Transfizierte Zellen wurden Fluoreszenzmikroskopisch identifiziert und die Zellmorphologie 24 h nach Transfektion dokumentiert. Um die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren wurde vor Belichtung des Films das Kulturmedium entfernt und durch PBS+/+ ersetzt.

Zur Darstellung transient transfizierter Einzelzellen in 40x Vergrößerung wurden Aufnahmen mit Belichtungsautomatik und manueller Einstellung der Belichtungszeit in 10-s-Intervallen unterhalb der automatisch gewählten Belichtungszeit angefertigt und nach Entwicklung korrekt belichtete Aufnahmen ausgewählt. Für die lichtmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen stabil transformierter Linien in 40x Vergrößerung wurden die Aufnahmen mit Belichtungsautomatik angefertigt.

### 3.9.2 Konfokalmikroskopie

Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen des F-Aktins fixierter CHO-Zellen wurden mit dem Zeiss Axioskop2 LSM 5 Pascal angefertigt. Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) baut auf dem Prinzip der Auflichtfluoreszenzmikroskopie auf. Dabei wird aber nur das Licht aus einem definierten Fokus des Präparats von Photomultipliertubes detektiert und anschließend aus den Signalen der abgerasterten Foci vom Computer ein Bild berechnet. Dieses stellt die Strukturen einer Bildebene ohne Überlagerung durch die anderen Bildebenen des Präparats dar. Für die Darstellung des Alexa-Fluor-546-markierten F-Aktins wurde das Präparat bei 488 nm angeregt und eine Filtereinheit bestehend aus Hauptfarbteiler (Dichromatischer Spiegel): 534 nm und Emissionsfilter: LP 560 nm verwendet. Zellen der Linien CHO-3E10, CHO-RhoAN19-EGFP und CHO-Cdc42N17-EGFP wurden in 24-Loch-Platten auf Glasplättchen ausplattiert. Nach Wachstum zu einem konfluenten Monolayer wurden die Zellen 2x mit PBS-/- gewaschen, mit 0,5 ml 3 % Paraformaldehydlösung für 20 min fixiert und erneut 2x mit PBS-/- gewaschen. Die hochspezifische Bindung von Phalloidin, einem primär aus *Amanita phalloides* isoliertem Peptidtoxin, an F-Aktin ist die Grundlage für die Anfärbung des F-Aktins als wesentlichem Bestandteil des Zytoskeletts. Für die Anfärbung des F-Aktins wurden die Zellen durch fünfzehnminütige Inkubation mit 1 % Triton X-Lösung permeabilisiert und anschließend für 30 min mit Alexa-Fluor-546-konjugiertem Phalloidin in der Verdünnung 1 : 200 inkubiert. Nach jedem Arbeitsschritt wurden die Zellen mit PBS-/- gewaschen. Für die konfokalmikroskopische Detektion des angefärbten F-Aktins wurde die vom Zellrasen bedeckte Oberfläche des Glasplättchens auf einen Objektträger mit einem Tropfen Permafluor gelegt und mit Nagellack fixiert. Die Bilder wurden in 63facher Vergrößerung aufgenommen.

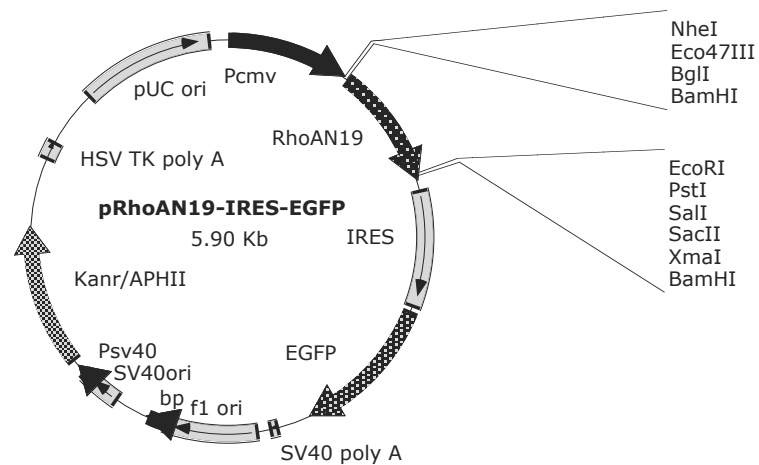
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Subklonierung von RhoAN19, Rac1N17 und Cdc42N17

Um transfizierte von nicht transfizierten Zellen zu unterscheiden, wurde in nachfolgenden Experimenten neben dem Gen von Interesse auch ein Gen für das Grüne Fluoreszenzprotein in die Zellen transfiziert. Die Expression beider Proteine von einem mRNA-Transkript unter Verwendung des pIRES2-EGFP-Vektors führt zu einem definierten Mengenverhältnis zwischen exprimiertem Protein von Interesse und Fluoreszenzprotein von  $\sim 2,5 : 1$  [Mizuguchi et al., 2000]. Außerdem erlaubt der pIRES2-EGFP-Vektor die Selektion transformierter Zellen durch Expression eines Antibiotikaresistenzgens in eukaryoten Zellen. Deshalb wurden die für inaktive Varianten der Proteine RhoA, Rac1 und Cdc42 codierenden Mutanten aus dem Vektor pRK5 ausgeschnitten und in die MCS des bicistronischen Expressionsvektors pIRES2-EGFP eingefügt. Diese Plasmide wurden später für die transiente Expression in der Linie CHO-3E10 genutzt und für die Generation der stabilen Linien CHO-RhoAN19 und Cdc42N17 verwendet.

Nachfolgend sind die neuen Vektoren und ihre für das jeweilige GTP-bindende Protein codierende Sequenz dargestellt. Diese wurde durch Sequenzierung bei der Firma Qiagen, Hilden und Vergleich der Sequenz mit dem jeweiligen Code für den Wildtyp des betreffenden Gens überprüft, wobei zum Vergleich der Gensequenzen das über das Internet zugängliche „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA genutzt wurde [Altschul et al., 1990]. Der Vergleich der mutierten Sequenzen mit dem jeweiligen Wildtyp zeigt die mit der inaktivierenden Mutation in Ras (T17N) korrespondierenden inaktivierenden Mutationen für RhoA, Rac1 und Cdc42 [Self und Hall, 1995]. **Rot** dargestellt sind in der jeweiligen Gensequenz Mutationen, die eine geänderte Aminosäure im Protein zur Folge haben, *kursiv* dargestellt sind stille Mutationen, die ohne Folge für die Aminosäureabfolge des Proteins sind, mit **Grün** sind die Start- und Stopcodons für die Translation gekennzeichnet und mit **Blau** die für das Myc-Epitop codierende Nukleotidsequenz.

#### 4.1.1 pRhoAN19-IRES-EGFP



**Abb. 6: Vektorkarte pRhoAN19-IRES-EGFP**

#### Sequenzierungsergebnis

GTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGA

Translationsstart

myc-tag

CTCAGATCTC GACGATTGAA TTGGCCACC .ATG.GAG.CAG.AAG.CTG.ATC.TCC.GAG.GAG.  
GAC.CTG.GGA.TCC.CCG.GCT.GCC.ATC.CGG.AAG.AAA.CTG.GTG.ATT.GTT.GGT.GAT.GGA.

T19N

24 F25N

GCC.TGT.GGA.AAG.AAC.TGC.TTG.CTC.ATA.GTT.AAC.AGC.AAG.GAC.CAG.TTC.CCA.GAG.  
GTG.TAT.GTG.CCC.ACA.GTG.TTT.GAG.AAC.TAT.GTG.GCA.GAT.ATC.GAG.GTG.GAT.GGA.  
AAG.CAG.GTA.GAG.TTG.GCT.TTG.TGG.GAC.ACA.GCT.GGG.CAG.GAA.GAT.TAT.GAT.CGC.  
CTG.AGG.CCC.CTC.TCC.TAC.CCA.GAT.ACC.GAT.GTT.ATA.CTG.ATG.TGT.TTT.TCC.ATC.  
GAC.AGC.CCT.GAT.AGT.TTA.GAA.AAC.ATC.CCA.GAA.AAG.TGG.ACC.CCA.GAA.GTC.AAG.  
CAT.TTC.TGT.CCC.AAC.GTG.CCC.ATC.ATC.CTG.GTT.GGG.AAT.AAG.AAG.GAT.CTT.CGG.  
AAT.GAT.GAG.CAC.ACA.AGG.CGG.GAG.CTA.GCC.AAG.ATG.AAG.CAG.GAG.CCG.GTG.AAA.  
CCT.GAA.GAA.GGC.AGA.GAT.ATG.GCA.AAC.AGG.ATT.GGC.GCT.TTT.GGG.TAC.ATG.GAG.  
TGT.TCA.GCA.AAG.ACC.AAA.GAT.GGA.GTG.AGA.GAG.GTT.TTT.GAA.ATG.GCT.ACG.AGA.

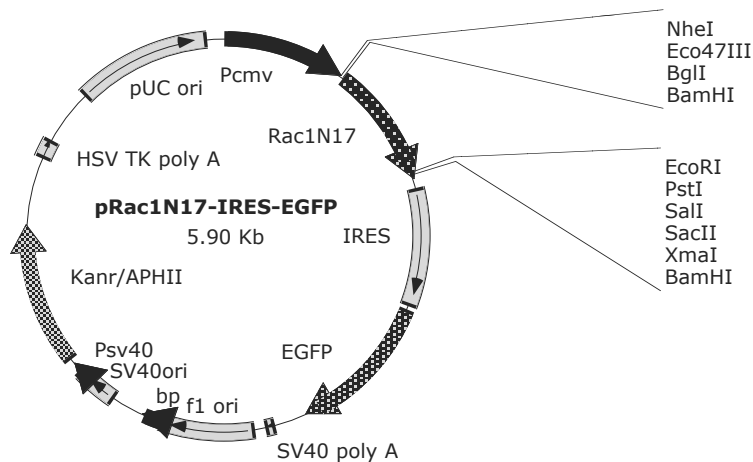
Stop

GCT.GCT.CTG.CAA.GCT.AGA.CGT.GGG.AAG.AAA.AAA.TCT.GGG.TGC.CTT.GTC.TTG.TGA.  
AAGCTGGGAA TTCCTGCAGT CGACGG

Der Vergleich mit der codierenden Sequenz für Homo sapiens ras homology gene family, member A (gi: 17439388) zeigt folgende Differenzen:

T19N: Durch Mutation in Codon 19 (ACA→AAC) wird Asparagin (N) statt Threonin (T) codiert, diese Mutation verändert das Protein in eine bezüglich seiner GTP-bindenden Aktivität inaktive Variante. F25N: Durch Mutation in Codon 25 (TTC→AAC) wird Asparagin (N) statt Phenylalanin (F) codiert, diese vorbeschriebene Mutation nimmt keinen Einfluss auf die biologische Aktivität, aber erhöht die Stabilität des Proteins und wird anerkannterweise in experimentellen Anordnungen genauso wie der Wildtyp genutzt [Self und Hall, 1995]. Die Mutation in Codon 24 (GTC→GTT) ist still. Der Sequenz für RhoAN17 geht die Sequenz für das Myc-Epitop voraus, und beide sind von Start- und Stopcodon korrekt eingeschlossen.

#### 4.1.2 pRac1N17-IRES-EGFP



**Abb. 7: Vektorkarte pRac1N17-IRES-EGFP**

## Sequenzierungsergebnis

Translationsstart myctag

CAGATCCGCT AGCGCTACCG GACTCAGATC TCGACGATTG AATTGGCCAC **ATG.GAG.CAG.**  
**AAG.CTG.ATC.TCC.GAG.GAG.GAC.CTG.**GGA.TCC.CCG.CAG.GCC.ATC.AAG.TGT.GTG.GTG.

T17N

GTG.GGA.GAC.GGA.GCT.GTA.GGT.AAA.**AAT**.TGC.CTA.CTG.ATC.AGT.TAC.ACA.ACC.AAT.  
 GCA.TTT.CCT.GGA.GAA.TAT.ATC.CCT.ACT.GTC.TTT.GAC.AAT.TAT.TCT.GCC.AAT.GTT.ATG.  
 GTA.GAT.GGA.AAA.CCG.GTG.AAT.CTG.GGC.TTA.TGG.GAT.ACA.GCT.GGA.CAA.GAA.GAT.  
 TAT.GAC.AGA.TTA.CGC.CCC.CTA.TCC.TAT.CCG.CAA.ACA.GAT.GTG.TTC.TTA.ATT.TGC.TTT.  
 TCC.CTT.GTG.AGT.CCT.GCA.TCA.TTT.GAA.AAT.GTC.CGT.GCA.AAG.TGG.TAT.CCT.GAG.  
 GTG.CGG.CAC.CAC.TGT.CCC.AAC.ACT.CCC.ATC.ATC.CTA.GTG.GGA.ACT.AAA.CTT.GAT.  
 CTT.AGG.GAT.GAT.AAA.GAC.ACG.ATC.GAG.AAA.CTG.AAG.GAG.AAG.AAG.CTG.ACT.CCC.  
 ATC.ACC.TAT.CCG.CAG.GGT.CTA.GCC.ATG.GCT.AAG.GAG.ATT.GGT.GCC.GTA.AAA.TAC.  
 CTG.GAG.TGC.TCG.GCG.CTC.ACA.CAG.CGA.GGC.CTC.AAG.ACA.GTG.TTT.GAC.GAA.GCG.  
 ATC.CGA.GCA.GTC.CTC.TGC.CCG.CCT.CCC.GTG.AAG.AAG.AGG.AAG.AGA.AAA.TGC.CTG.  
 CTG.TTG.TAA.GAA.TTC.CTG.CAG.TCG.ACG.GTA.CCG.CGG.GCC.CGG.GAT.CCG.CCC.CTC.

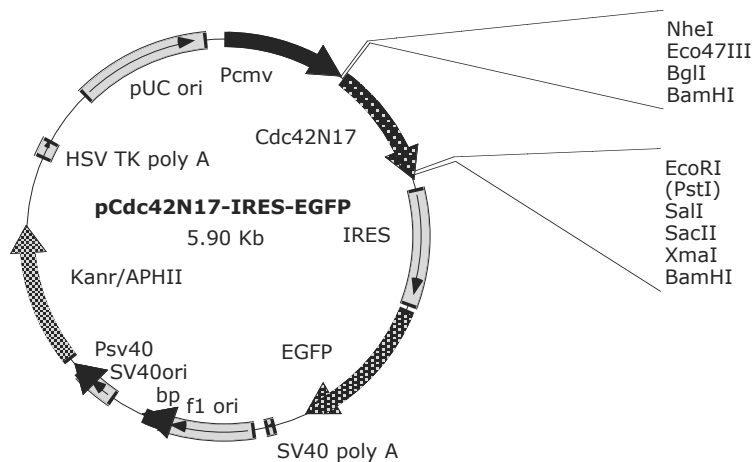
Stop

TCC.CTC.CCC.CCC.CCC.**TAA**. CGTTACTGGC

Der Vergleich mit der codierenden Sequenz für Human ras-related C3 botulinum toxin substrate (rac) zeigt folgende Differenzen:

T17N: Durch Mutation in Codon 17 (ACT→AAT) wird Asparagin (N) statt Threonin (T) codiert, diese Mutation verändert das Protein in eine bezüglich seiner GTP-bindenden Aktivität inaktive Variante. Die Mutation in Codon 151 (GCT→GCC) ist still. Der Sequenz für Rac1N17 geht die Sequenz für das Myc-Epitop voraus und beide sind von Start- und Stopcodon korrekt eingeschlossen.

### 4.1.3 pCdc42N17-IRES-EGFP



**Abb. 8: Vektorkarte pCdc42N17-IRES-EGFP**

#### Sequenzierungsergebnis

CAGATCCGCT AGCGCTACCG GACTCAGATC TCGACGATTG AATTGGCCAC C

Translationstart                      myc-tag

ATG.GAG.CAG.AAG.CTG.ATC.TCC.GAG.GAG.GAC.CTG.GGA.TCC.CAG.ACA.ATT.AAG.TGT.

T17N

GTT.GTT.GTG.GGC.GAT.GGC.GCC.GTT.GGT.AAA.AAC.TGT.CTC.CTG.ATA.TCC.TAC.ACA.  
 ACA.AAC.AAA.TTT.CCA.TCG.GAG.TAT.GTA.CCG.ACT.GTT.TTT.GAC.AAC.TAT.GCA.GTC.  
 ACA.GTT.ATG.ATT.GGT.GGA.GAA.CCA.TAT.ACT.CTT.GGA.CTT.TTT.GAT.ACT.GCA.GGG.  
 CAA.GAG.GAT.TAT.GAC.AGA.TTA.CGA.CCG.CTG.AGT.TAT.CCA.CAA.ACA.GAT.GTA.TTT.  
 CTA.GTC.TGT.TTT.TCA.GTG.GTC.TCT.CCA.TCT.TCA.TTT.GAA.AAC.GTG.AAA.GAA.AAG.TG.  
 GTG.CCT.GAG.ATA.ACT.CAC.CAC.TGT.CCA.AAG.ACT.CCT.TTC.TTG.CTT.GTT.GGG.ACT.  
 CAA.ATT.GAT.CTC.AGA.GAT.GAC.CCC.TCT. ACT.ATT.GAG.AAA.CTT.GCC.AAG.AAC.  
 AAA.CAG.AAG.CCT.ATC.ACT.CCA.GAG. ACT.GCT.GAA.AAG.CTG.GCC.CGT.GAC.CTG.  
 AAG.GCT.GTC.AAG.TAT.GTG.GAG. TGT.TCT.GCA.CTT.ACA.CAG.AGA.GGT.CTG.AAG.  
 AAT.GTG.TTT.GAT.GAG.GCT.ATC.CTA.GCT.GCC.CTC.GAG.CCT.CCG.GAA.ACT.CAA.CCC.  
 AAA.AGG.AAG.TGC. TGT.ATA.TTC.TAA.GAA.CGA.TTG.AAT.TGG.CCA.CCA.TGG.AGC.AGA.

Stop

AGC.TGA.TCTCCGAGGAGGACCTGGGATCCCAGACAATTAAGTGTGTTGTTGTGGGCGATGG  
 CGCCGTTGGTA.AAACTGTCTCCTGA.TATCCTACA

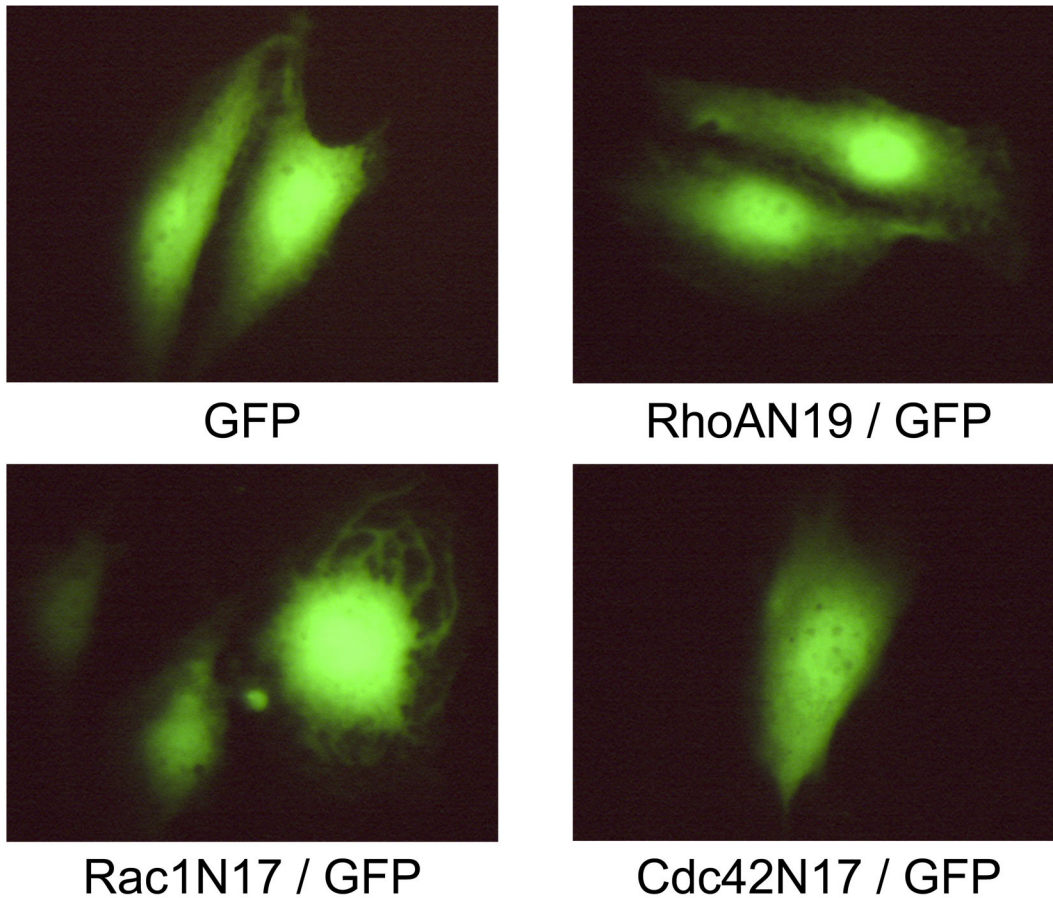


Ein Vergleich mit der codierenden Sequenz für Human GTP-binding Protein (G25K) (gi: 182856) zeigt folgende Differenzen: T17N: Durch Mutation in Codon 17 (ACA→AAT) wird Asparagin (N) statt Threonin (T) codiert, diese Mutation verändert das Protein in eine bezüglich seiner GTP-bindenden Aktivität inaktive Variante. Die Mutationen in Codon 12 (GGT→GGC) und Codon 13 (GCT→GCC) sind still. Der Sequenz für Cdc42N17 geht die Sequenz für das Myc-Epitop voraus und beide sind von Start- und Stopcodon korrekt eingeschlossen.

#### **4.2 Zellmorphologie nach Expression von RhoAN19, Rac1N17, Cdc42N17**

Der immunfluoreszenzmikroskopische Nachweis veränderter zellmorphologischer Merkmale wie der Ausbildung von Stressfasern in fibroblastären Zellen nach Mikroinjektion aktiver Proteinmutanten war die erste beschriebene Wirkung von Proteinen der Rho-Familie [Ridley et al., 1992]. In dieser Arbeit wurde deshalb die Zellmorphologie nach Überexpression der inaktiven Varianten RhoAN19, Rac1N17, Cdc42N17 in Endothelzellen und CHO-3E10-Zellen dokumentiert. Es wurden fluoreszenzmikroskopisch dargestellte GFP-positive Zellen 24 h nach Transfektion fotografiert. In Endothelzellen konnte für die einzelnen Mutanten keine sicher unterschiedliche Zellmorphologie nachgewiesen werden, transfizierte Zellen zeigten aber eher ein entspanntes weites Zytoplasma. Mit Mutanten transfizierte Endothelzellen waren tendenziell größer als nur mit GFP und Leervektor transfizierte Kontrollzellen. Abbildung 9 zeigt repräsentative Beispiele für die Transfektion mit den einzelnen Mutanten. In Zellen der Linie CHO-3E10 zeigten sich für jede der einzelnen Mutanten charakteristische Veränderungen gegenüber der Kontrolle mit EGFP. Abbildung 10 zeigt typische Beispiele für jede der Mutanten und die allein EGFP-transfizierten Kontrollen. RhoAN19-transfizierte Zellen waren eher größer mit weitem Zytoplasma. Rac1N17-transfizierte Zellen bildeten häufiger Vesikel, die über den Zelleib verteilt erschienen. Cdc42N17-transfizierte Zellen waren häufig kleiner, eher abgerundet mit scharfer kontinuierlicher Zellbegrenzung. Im Unterschied zu in der Literatur beschriebenen Veränderungen unter aktiven GTPasen wurde hier allein die Zellform und die GFP-Verteilung in der Zelle nach Überexpression inaktiver GTPasen dargestellt.

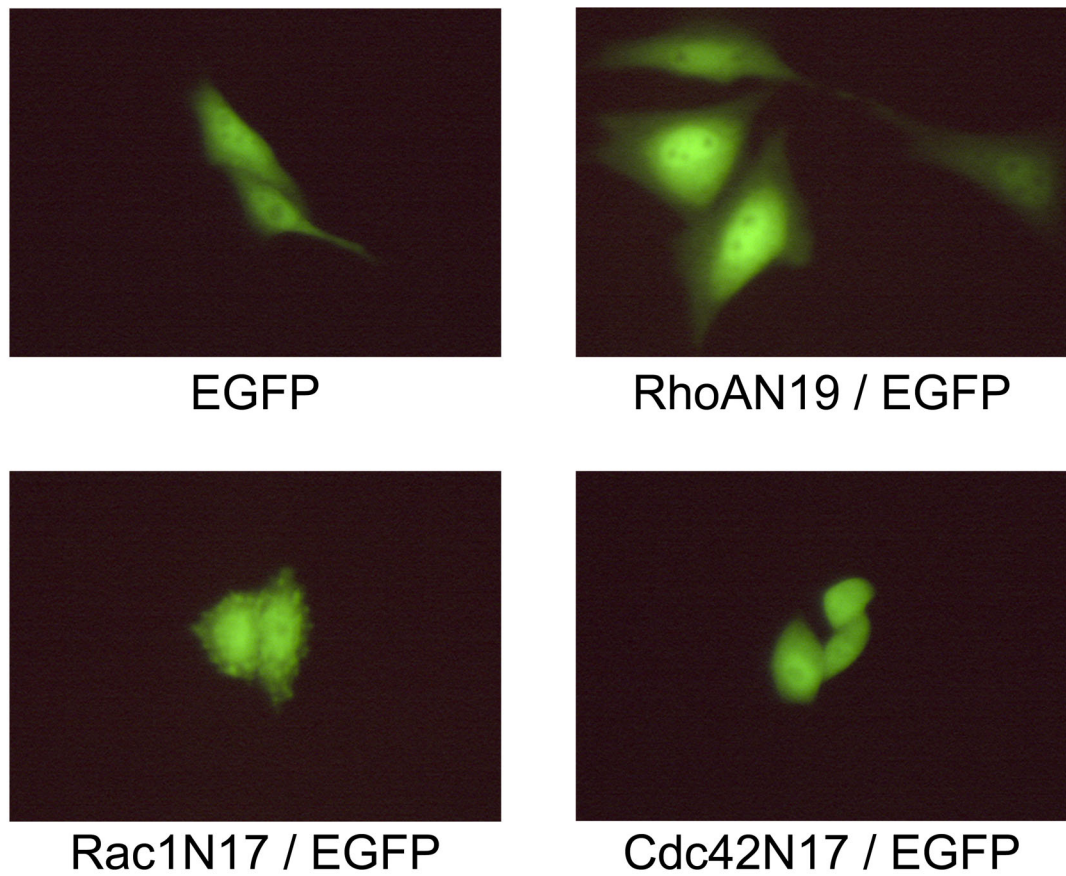
#### 4.2.1 Humane mikrovaskuläre Endothelzellen der Linie HPMEC-ST1.6R



**Abbildung 9: Endothelzellen der Linie HPMEC-ST1.6R 24 Stunden nach Transfektion**

Zellen der Linie HPMEC-ST1.6R wurden wie unter 3.4.1 beschrieben im Verhältnis 1:1 mit pGreenLantern1 und den Mutanten pRK5-RhoAN19, pRK5-Rac1N17, pRK5-Cdc42N17 oder pRK5-Leer transfiziert. Repräsentative GFP-positive Zellen in fluoreszenzmikroskopischer Darstellung sind abgebildet. Nach Transfektion mit Rac1N17 zeigten sich häufiger Zellen mit fadenförmigen vom Kern her radiären Strukturen.

#### 4.2.2 Zellen der LPS-reagiblen Reporterlinie CHO-3E10



**Abbildung 10: Zellen der Linie CHO-3E10 24h nach Transfektion**

Zellen der Linie CHO-3E10 wurden wie unter 3.4.2 beschrieben mit pRhoAN19-IRES-EGFP, pRac1N17-IRES-EGFP, pCdc42N17-IRES-EGFP oder pIRES-EGFP transfiziert. Zu sehen sind EGFP-positive Zellen in fluoreszenzmikroskopischer Darstellung mit den jeweils charakteristischen Veränderungen.

#### 4.3 Überexpression von RhoAN19, Rac1N17, Cdc42N17 und Expression von IL-8/CXCL8 in Endothelzellen der Linie HPMEC-ST1.6R

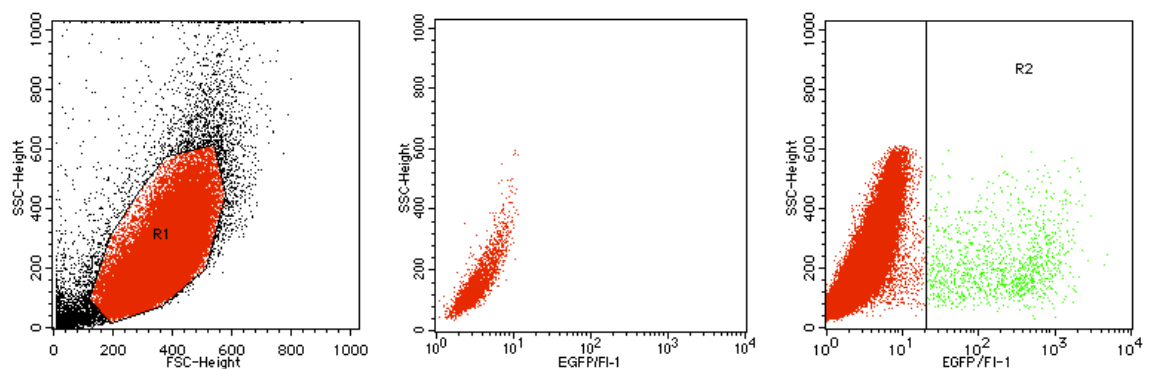
Vorhergehende Arbeiten hatten die Hemmung der LPS-stimulierten IL-8/CXCL8-Sekretion durch enzymatisch wirksame Toxine, die GTPasen der Rho-Familie inhibieren, gezeigt [Hippenstiel et al., 2000]. Hier wurde für die einzelnen Mitglieder der Rho-Familie RhoA, Rac1 und Cdc42 ihre jeweilige Bedeutung für die IL-8/CXCL8-Expression untersucht, indem inaktive Mutanten der Gene überexprimiert wurden. Um das Problem der niedrigen Transfektionseffizienz in humanen Endothelzellen zu lösen, wurde die GFP-assozierte flusszytometrische intrazelluläre IL-8/CXCL8-Messung etabliert.

Humane mikrovaskuläre Endothelzellen der Linie HPMEC-ST1.6R wurden mit den inaktiven Varianten der GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 und dem GFP-Expressionsvektor pGreenLantern1 transfiziert. Nach Stimulation mit LPS von *E. coli* in der Konzentration 150 ng/ml für 8 h wurden die Zellen fixiert und intrazelluläres IL-8/CXCL8 flusszytometrisch bestimmt. Mit Leervektor und GFP-Expressionsvektor transfizierte Zellen dienten nicht LPS-stimuliert als Negativkontrolle und LPS-stimuliert als Positivkontrolle.

Die flusszytometrische Bestimmung GFP-positiver Zellen einen Tag nach Transfektion subkonfluenten humaner mikrovaskulärer Endothelzellen allein mit dem GFP-Expressionsvektor pGreenLantern1 (2 µg Plasmid-DNA) ergab eine Transfektionseffizienz von 3–4 %. Der Anteil gemessener GFP-positiver Zellen verminderte sich in den durchgeführten Experimenten auf knapp 1 %, weil die Zellen bedingt durch die Stimulation erst am zweiten Tag nach Transfektion gemessen wurden und außerdem 1:1 mit dem jeweiligen pRK5-GTPase Plasmid (1 µg Plasmid-DNA) und pGreenLantern1 (1 µg Plasmid-DNA) transfiziert wurden.

Für die flusszytometrische Messung wurden zunächst die transfizierten Zellen durch Gating der GFP-positiven Zellen ausgewählt. Abbildung 11 zeigt in drei mit Cell Quest Pro erstellten Dot Plots das Gating der GFP-positiven Zellen, in denen intrazelluläres IL-8/CXCL8 gemessen wurde. Im linken Dot Plot der Abb. 11 werden in der Region R1 Zellen von mittlerer Größe und Granularität ausgewählt. Im mittleren und rechten Dot Plot ist die Fluoreszenz im Kanal FI-1(530/30), in dem GFP detektiert wird, gegen die Granularität aufgetragen.

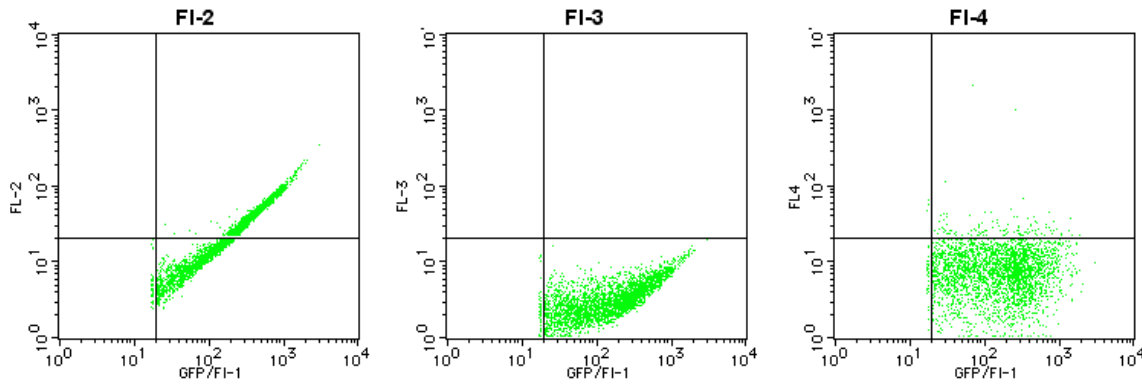
Im mittleren Dot Plot ist eine Probe nicht transfizierter Zellen dargestellt, die genutzt wurde, um die Eigenfluoreszenz der Endothelzellen zu bestimmen und eine Region R2 GFP-positiver Zellen zu definieren. Im linken Dot Plot sind Zellen dargestellt, die einer Transfektion unterzogen wurden, wobei die tatsächlich transfizierte Subpopulation in der Region R2 zur Bestimmung von IL-8/CXCL8 ausgewählt wurde. Dazu wurde das Gate1 = R1\*R2 definiert, in dem pro Meßwert 5000 Zellen gezählt wurden.



**Abb. 11: Gating der transfizierten Endothelzellen anhand ihrer GFP-bedingten Fluoreszenz in FI-1**

Im linken Dot Plot ist die Granularität gegen die Größe aufgetragen. Es wurden Zellen mittlerer Granularität und Größe in der Region R1 (rot) ausgewählt, die im mittleren und rechten Dot Plot dargestellt sind. Im mittleren und rechten Dot Plot ist die Granularität gegen die Fluoreszenz in FI-1 aufgetragen. Zu sehen ist im mittleren Dot Plot eine Probe, die keiner Transfektion unterzogen wurde, und im rechten Dot Plot eine der Transfektion unterzogene Probe, die sich in eine GFP-negative Population (rot) und eine GFP-positive Population in der Region R2 (grün) aufteilt.

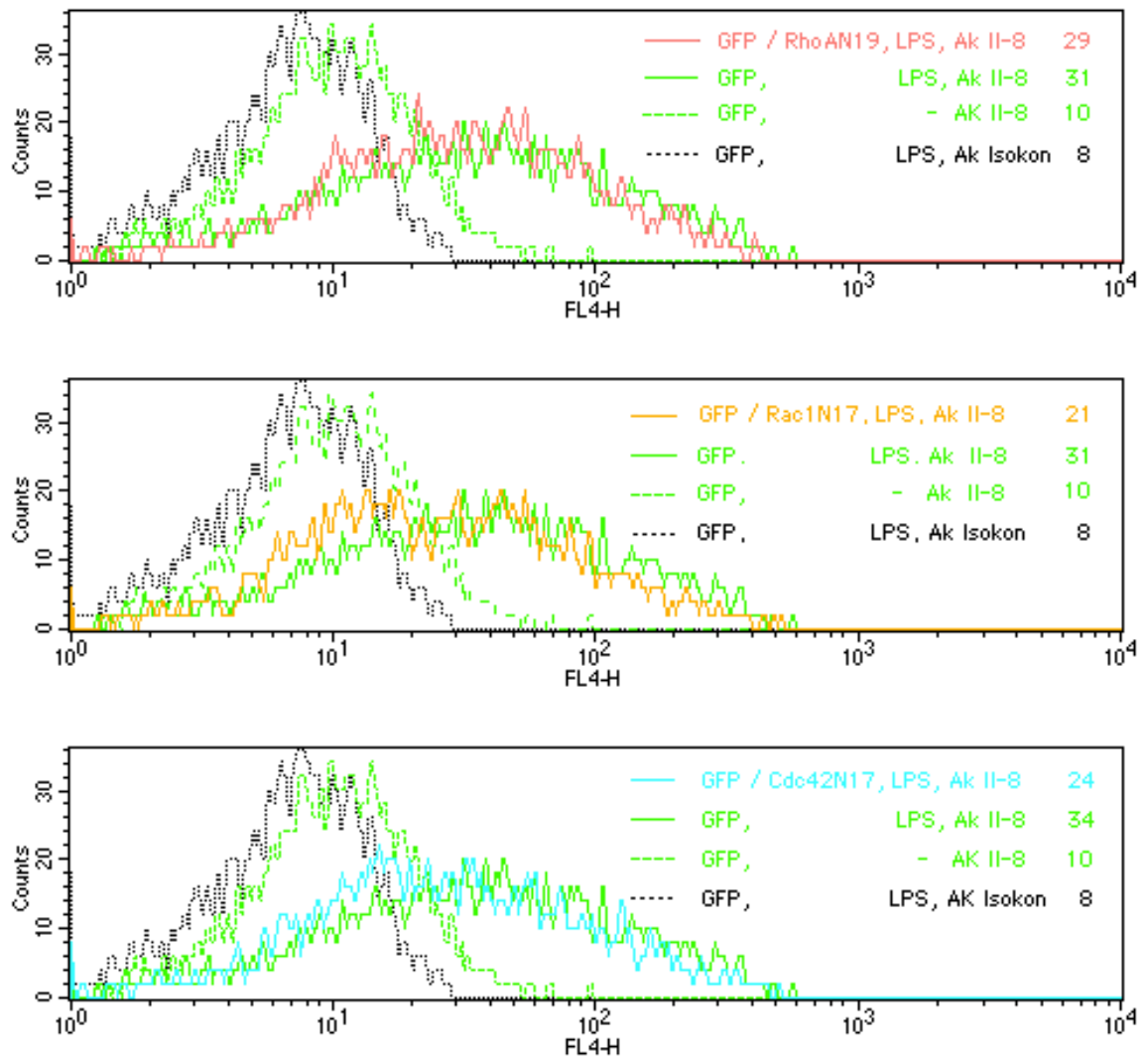
Die Messung von IL-8/CXCL8 erfolgte nach Färben mit einem Cyanin5-konjugierten Antikörper im Kanal FI-4 (661/16). Abbildung 12 zeigt, dass die IL-8/CXCL8-Messung nicht in den Kanälen FI-2 und FI-3 möglich war, weil GFP-positive Zellen auch in diesen beiden Kanälen ein (nicht kompensierbares) Signal verursachten.



**Abb. 12: Fluoreszenz GFP-transfizierter Zellen in den einzelnen Kanälen**

Auf der Abszisse ist in allen Dot Plots die Fluoreszenz in FI-1 abgetragen, anhand derer transfizierte Zellen identifiziert wurden. Auf der Ordinate ist in dem Dot Plot links die Fluoreszenz in FI-2, auf dem Dot Plot in der Mitte die Fluoreszenz in FI-3 und in dem Dot Plot rechts die Fluoreszenz in FI-4 abgetragen. Die Dot Plots zeigen GFP-bedingte nicht kompensierbare Fluoreszenz in FI-2 und FI-3, aber keine GFP-bedingte Fluoreszenz in Kanal FI-4, der für die quantitative Bestimmung von IL-8/CXCL8 genutzt wurde.

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse aus einem repräsentativen Versuch für alle drei getesteten inaktiven GTPasen jeweils als Histogramm der Fluoreszenzintensität in FI-4 dargestellt. Induzierbare Antigene wie das gemessene IL-8/CXCL8 sind im Gegensatz zu konstitutiv exprimierten Oberflächenantigenen meist nicht normalverteilt, und das Histogramm wird deshalb optimal durch den Median seiner Werte beschrieben.



**Abb. 13: Histogrammdarstellung der für IL-8/CXCL8 repräsentativen in FL-4 gemessenen Fluoreszenzwerte**

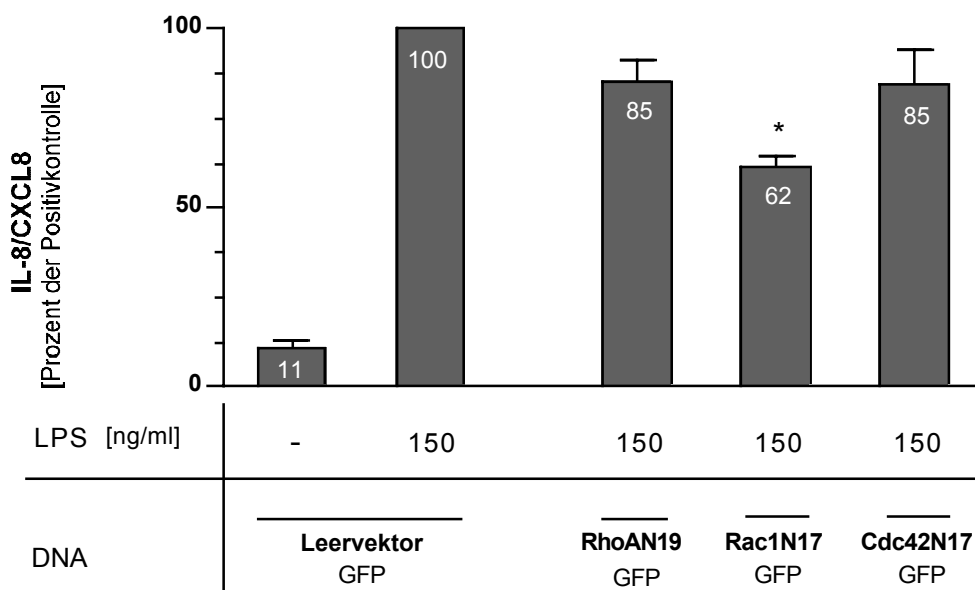
Zu sehen ist jeweils die Linksverschiebung der Histogramme für die Transfektion mit RhoAN19 (blau oben), für Rac1N17 (orange, Mitte) und Cdc42N17 (rot, unten) gegenüber dem Histogramm für stimulierte GFP/Leervektor-transfizierte Zellen (grün, durchgezogen). In Grün und gestrichelt ist die Histogrammlinie für nicht stimulierte Zellen, in Grau und gepunktet die Linie für die Isotypenkontrolle dargestellt. Zugehörige Medianwerte der Fluoreszenz stehen jeweils oben rechts.

In Abb. 14 sind die Ergebnisse aus drei voneinander unabhängigen Versuchen dargestellt. Die Fluoreszenzintensität der Positivkontrolle (Leervektor/GFP-transfiziert und LPS-stimuliert) wurde gleich 100 % gesetzt und die übrigen Werte wurden in Prozent der Positivkontrolle angegeben. Der Wert der Isotypenkontrolle als Ausdruck unspezifischer Antikörperbindung wurde von den übrigen Meßwerten jeweils abgezogen. Die Stimulation mit 150 ng/ml LPS über 8 h führte zu einer Erhöhung der IL-8/CXCL8-Expression in Endothelzellen um den Faktor 10.

Es wurde gezeigt, dass die Überexpression jeder einzelnen der drei getesteten



inaktiven GTPasen die Expression von IL-8/CXCL8 vermindert. Die Abnahme an IL-8/CXCL8 ist für Rac1N17 mit 62 % des Kontrollwerts am ausgeprägtesten, während die Überexpression von RhoAN19 und Cdc42N17 zu einer Abnahme auf jeweils 85 % führt. Wie unter 5.2 diskutiert ist bei diesen Werten zu bedenken, dass die Hälfte der zellulären Kapazität zur Überexpression von transfiziertem Plasmid durch die Expression von GFP beansprucht wird und die gemessenen Abnahmen an IL-8/CXCL8 jeweils Mindestwerte darstellen, die bei Verzicht auf die Koexpression von GFP vermutlich unterschritten werden.



#### Abb. 14: Expression von IL-8/CXCL8 in humanen mikrovaskulären Endothelzellen

Zellen der Linie HPMEC-ST1.6R wurden im Verhältnis 1 : 1 mit dem jeweiligen pRK5-GTPasen-Plasmid und pGreenLantern1 transfiziert. 36 h später wurde für 8 h mit 150 ng/ml LPS stimuliert und in GFP-positiven Zellen intrazelluläres IL-8/CXCL8 gemessen. IL-8/CXCL8-Werte aus pRK5-Leervektor/GFP-transfizierten und -stimulierten Zellen wurden gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des Mittelwerts der Ergebnisse aus drei unabhängigen FACS-Messungen. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ ) gegenüber der Positivkontrolle sind gekennzeichnet (\*).

Nachdem gezeigt wurde, dass alle drei Proteine Rac1, Cdc42 und RhoA in der LPS-induzierten Signaltransduktion beteiligt sind, wurde untersucht, wie sich die Überexpression der inaktiven Varianten von Rac1, Cdc42 und RhoA auf die Aktivierung verschiedener Reporterkonstrukte für Transkriptionsfaktoren auswirkt.

Es wurden zwei verschiedene Reportersysteme verwendet: Zunächst die



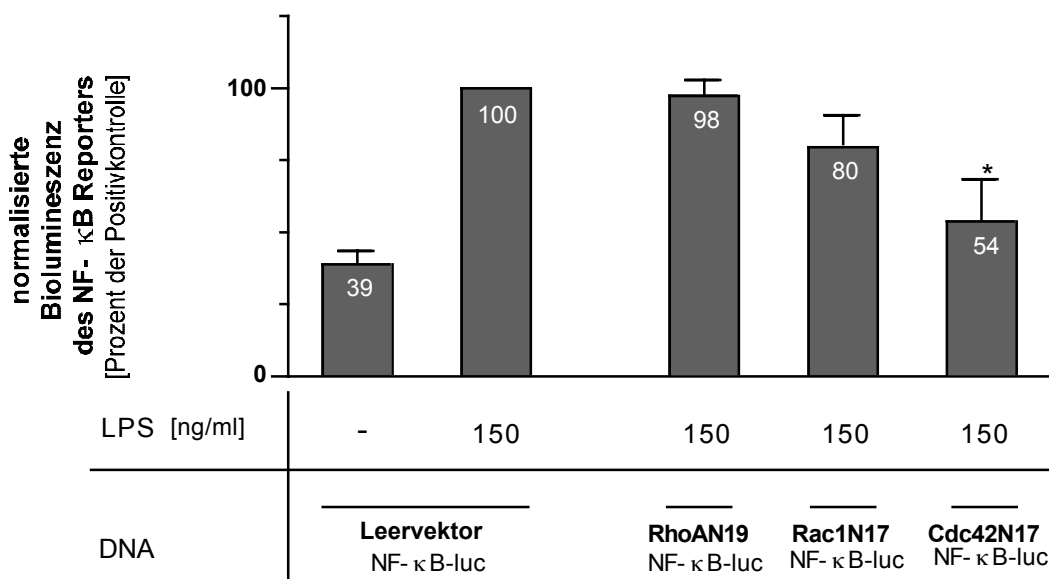
transiente Transfektion des NF- $\kappa$ B-Reporterkonstruktes pGL3.BG.6 $\kappa$ B in Zellen der Linie HPMEC-ST1.6R, darüber hinaus die stabil transfizierte LPS-reagible Reporterzelllinie CHO-3E10, deren Verstärkerregion einen Ausschnitt aus der Verstärkerregion des ELAM-1/CD62E -Gens enthält und Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 aufweist.

#### **4.4 Überexpression von RhoAN19, Rac1N17, Cdc42N17 und Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Endothelzellen der Linie HPMEC-ST1.6R**

Die IL-8/CXCL8-Verstärkerregion weist Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B auf und in der Arbeit von Hippenstiel wurde mit Hilfe des Reporterplasmids pGL3.BG.6 $\kappa$ B gezeigt, dass die LPS-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B in humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVEC) durch GTPasen hemmende Toxine inhibiert wird [Hippenstiel et al., 2000]. In dieser Arbeit wurde unter Verwendung desselben spezifischen NF- $\kappa$ B-Reporterkonstruktes die Wirkung der inaktiven Mutanten von RhoA, Rac1 und Cdc42 auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B untersucht.

Zellen der Linie HPMEC-ST1.6R wurden im Verhältnis 2 : 1 : 1 mit dem jeweiligen pRK5-GTPasen-Plasmid, dem NF- $\kappa$ B-Reporterplasmid pGL3.BG.6 $\kappa$ B und dem Plasmid pRSV $\beta$ -Gal transfiziert. Am folgenden Tag wurde für 6 h mit 150 ng/ml LPS stimuliert und nach Zellyse die Luziferase-abhängige Biolumineszenz als Maß für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die  $\beta$ -Galaktosidase-abhängige Lumineszenz zur Normalisierung der Luziferaseaktivität gemessen. Für die Auswertung wurden die normalisierte Lumineszenz für pRK5-Leervektor-transfizierte und -stimulierte Zellen gleich 100 % gesetzt und die anderen Lumineszenzen in Prozent dieses Wertes angegeben.

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die LPS-induzierte Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Reporterkonstrukts in humanen mikrovaskulären Endothelzellen wurde durch Überexpression von Cdc42N17 auf 54 % des Wertes für die mit Leervektor transfizierten Zellen reduziert. Rac1N17 reduzierte die Aktivierung des Reporterkonstruktes auf 80 %, und die Überexpression von RhoAN19 blieb praktisch ohne Auswirkung auf die Aktivierung des Reporterkonstruktes.



**Abb. 15: Aktivierung von NF-κB in humanen mikrovaskulären Endothelzellen**

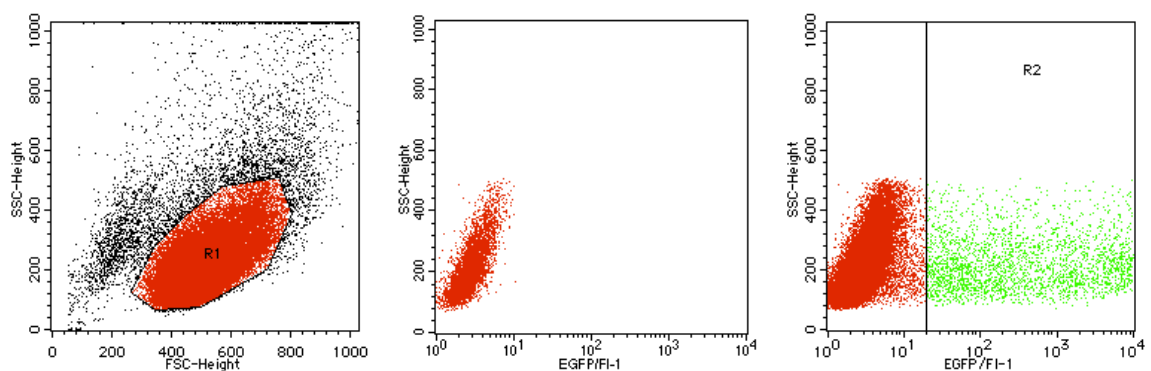
Die normalisierte Lumineszenz der pRK5-Leervektor-transfizierten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt, die normalisierte Lumineszenz der mit inaktiven Mutanten transfizierten Zellen ist in Prozent dieser Positivkontrolle dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des Mittelwerts aus drei unabhängigen Messungen. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ ) gegenüber der Positivkontrolle sind gekennzeichnet (\*).

#### **4.5 Überexpression von RhoAN19, Rac1N17, Cdc42N17 und Aktivierung des LPS-reagiblen Reporters in Zellen der Linie CHO-3E10**

Neben der Bindungsstelle für NF-κB finden sich in der Promotorregion des Gens für IL-8/CXCL8 Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren C/EBP-β und AP-1 [Wu et al., 1997]. Die speziell als LPS-reagible Linie konstruierte Reporterlinie CHO-3E10 enthält in der Verstärkerregion ihres Reporters einen Ausschnitt aus der Verstärkerregion des Gens für ELAM-1/CD62E und in diesem Ausschnitt ebenfalls Bindungsstellen für NF-κB und AP-1 [Delude et al., 1998; Jensen und Whitehead, 2003].

Weil die Reporterlinie bezüglich der Bindungsstellen in ihrem Promoter dem IL-8/CXCL8-Promotor sehr ähnlich ist, wurde in dieser Arbeit die Wirkung von RhoAN19, Rac1N17 und Cdc42N17 auf die Reporterexpression in CHO-3E10 untersucht. Das Reporterantigen CD25 wird nach LPS-Stimulation an der Zelloberfläche exprimiert und kann flusszytometrisch gemessen werden. In dieser Arbeit wurden transfizierte Zellen analog dem Vorgehen bei der intrazellulären Bestimmung von IL-8/CXCL8 als GFP-positive Zellen identifiziert und gemessen. Die Zellen wurden dazu mit den subklonierten Plasmiden pRhoAN19-IRES-EGFP, pRac1N17-IRES-EGFP, pCdc42N17-IRES-EGFP und dem Vektor pIRES2-EGFP transfiziert und 24 h nach Transfektion für 18 h mit 150 ng/ml LPS stimuliert. Das Reporterantigen CD25 wurde mit einem APC-konjugierten Antikörper nachgewiesen und seine Expression in nativen Zellen im Kanal FI-4 (661/16) des Facscalibur flusszytometrisch quantifiziert.

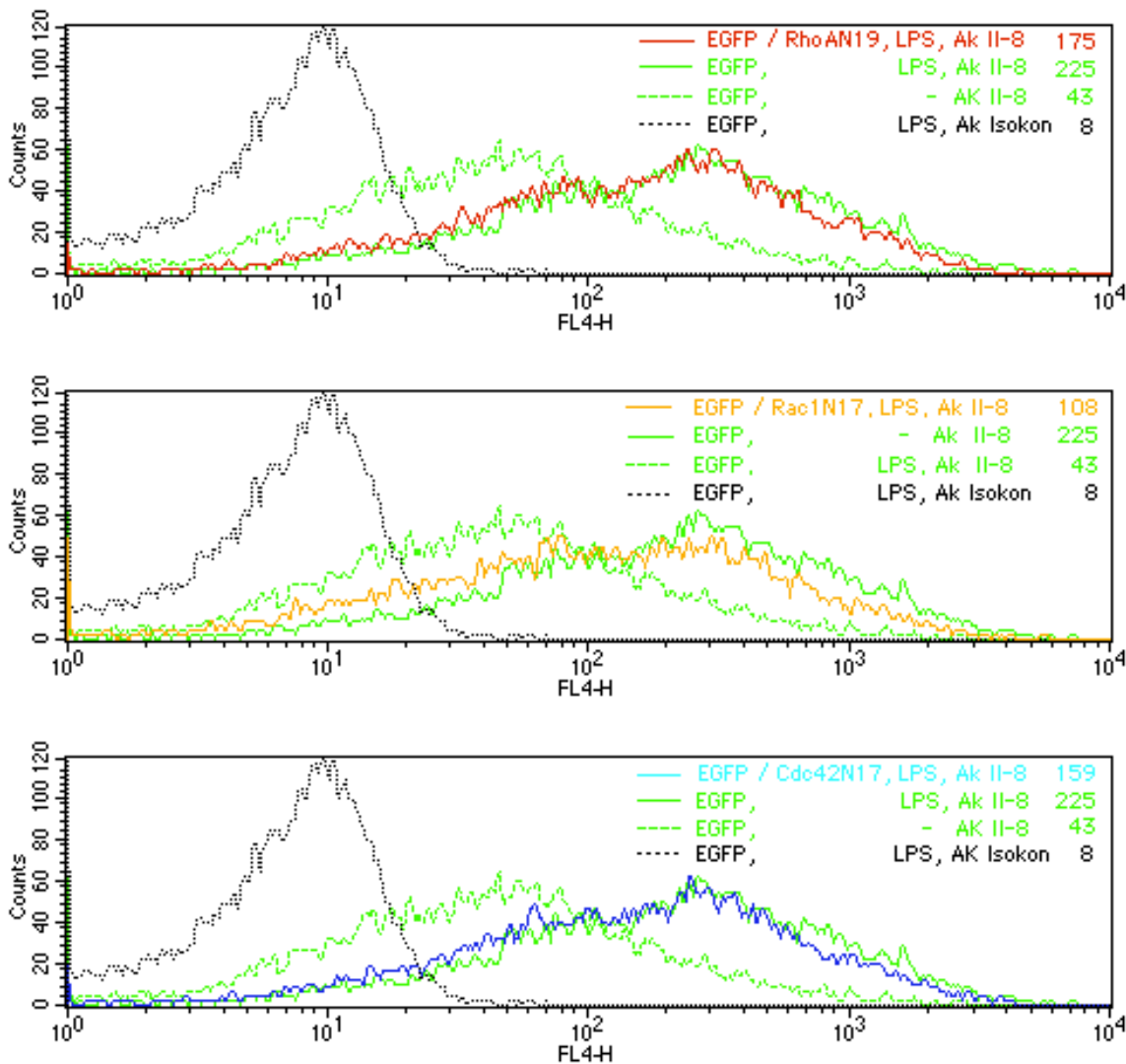
Abbildung 16 zeigt das Gating der EGFP-positiven Zellen, in denen das Reporterantigen CD25 gemessen wurde. Der linke Dot Plot der Abb. 14 zeigt die Auswahl von Zellen, die von mittlerer Größe und Granularität sind, in der Region R1. Im mittleren und rechten Dot Plot ist die Fluoreszenz im Kanal FI-1(530/30), in dem EGFP detektiert wird, gegen die Granularität aufgetragen. Im mittleren Dot Plot ist eine Probe nicht transfizierter Zellen dargestellt, die genutzt wurde, um die Eigenfluoreszenz der CHO-3E10-Zellen zu bestimmen und eine Region R2 EGFP-positiver Zellen zu definieren. Im linken Dot Plot sind Zellen dargestellt, die einer Transfektion unterzogen wurden, wobei die tatsächlich transfizierte Subpopulation in der Region R2 zur Bestimmung von CD25 ausgewählt wurde. Dazu wurde das Gate1 = R1\*R2 definiert, in dem pro Meßwert 10000 native Zellen gezählt wurden.



**Abb. 16: Gating der transfizierten CHO-3E10-Zellen anhand des EGFP**

Die Messung von CD25 erfolgte nach Färben mit einem APC-konjugierten Primärantikörper im Kanal FI-4 (661/16). In Abbildung 17 sind die Ergebnisse aus

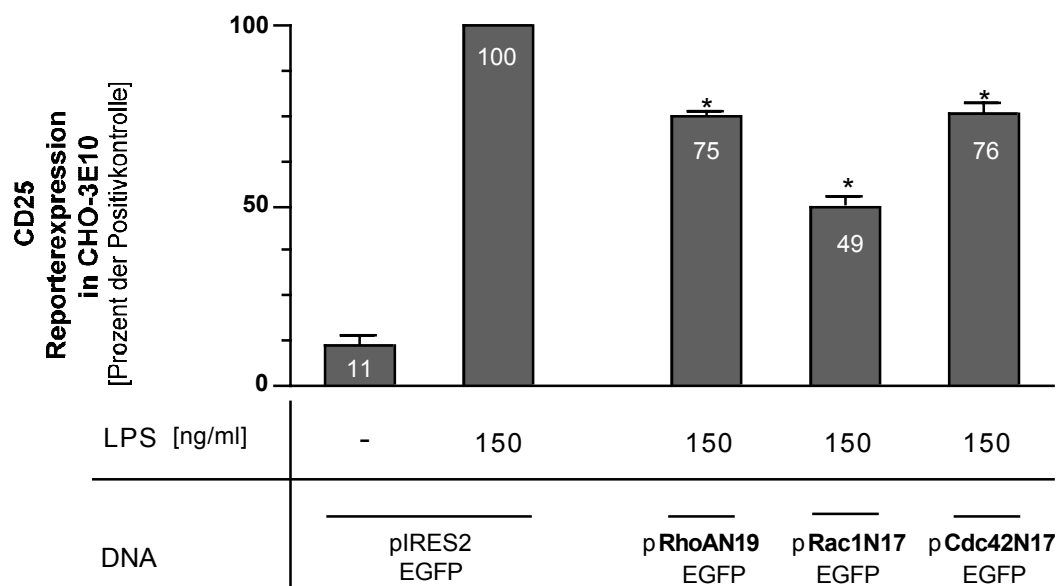
einem repräsentativen Versuch für alle drei getesteten inaktiven GTPasen jeweils als Histogramm der Fluoreszenzintensität in FL4 dargestellt. Die Werte für das Reporterprotein als induzierbares Antigen sind im Gegensatz zu konstitutiv exprimierten Oberflächenantigenen nicht normalverteilt und das Histogramm wird deshalb optimal durch den Median seiner Werte beschrieben.



**Abb. 17: Histogrammdarstellung der für den LPS-reagiblen Reporter CD25 repräsentativen Fluoreszenzwerte**

Gezeigt ist jeweils die Linksverschiebung der mit pRhoAN19-IRES-EGFP (oben), mit pRac1N17-IRES-EGFP (Mitte) und mit Cdc42N17-IRES-EGFP (unten) transfizierten Population gegenüber der pIRES2-EGFP-transfizierten Kontrollpopulation. Medianwerte der Fluoreszenz sind jeweils rechts oben im Diagramm angegeben.

In Abb. 18 sind die Ergebnisse aus drei voneinander unabhängigen Versuchen dargestellt. Die Fluoreszenzintensität der Positivkontrolle (pIRES2-EGFP-transfiziert und LPS-stimuliert) wurde gleich 100 % gesetzt und die übrigen Werte wurden in Prozent der Positivkontrolle angegeben. Der Wert der Isotypenkontrolle als Maß unspezifischer Antikörperbindung wurde von den übrigen Meßwerten jeweils abgezogen. Die Stimulation mit 150 ng/ml LPS über 18 h führte zu einer Erhöhung der Reporterexpression in Zellen der Linie CHO-3E10 um den Faktor 10. Das entspricht den Angaben in der Literatur für die Stimulation nicht transfizierter CHO-3E10-Zellen mit 100 ng/ml LPS für 18 h. Es wurde gezeigt, dass die Überexpression jeder einzelnen der drei getesteten inaktiven GTPasen die Expression des Reporters vermindert. Die Abnahme an CD25-Antigen ist für Rac1N17 mit 49 % des Kontrollwerts am stärksten, während die Überexpression von RhoAN19 und Cdc42N17 zu einer Abnahme auf 75 % und 76 % führt.



**Abb. 18: Expression von CD25 als LPS-reagiblen Reporter in Zellen der Linie CHO-3E10**

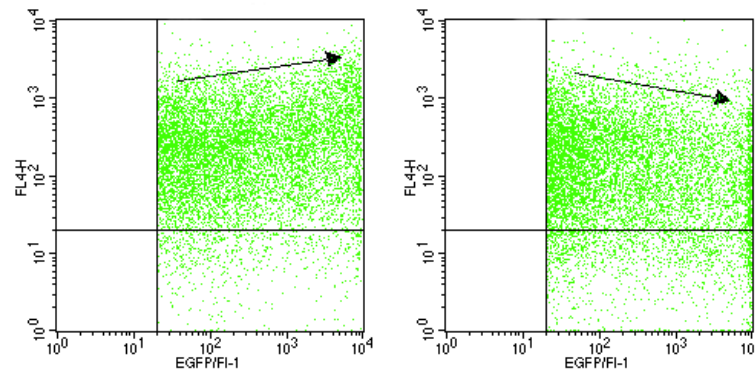
Zellen der Linie CHO-3E10 wurden mit dem jeweiligen pGTPasen-IRES-EGFP-Plasmid transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 18 h mit 150 ng/ml LPS stimuliert und für GFP-positive Zellen die CD25-Expression bestimmt. CD25-Werte aus pIRES-EGFP-transfizierten und -stimulierten Zellen wurden gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des Mittelwerts der Ergebnisse aus drei unabhängigen FACS-Messungen. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ ) gegenüber der Positivkontrolle sind gekennzeichnet (\*).

Die Stimulierbarkeit der Reporterexpression in der Linie 3E10 durch LPS um den Faktor 10 gegenüber nicht stimulierten Zellen liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die Stimulierbarkeit der IL-8/CXCL8-Expression humaner Endothelzellen durch LPS. Das quantitative Muster der verminderten Reporterexpression nach Überexpression von RhoAN19, Rac1N17 und Cdc42N17 in CHO-3E10 entspricht dem Muster der reduzierten Expression von IL-8/CXCL8 in den untersuchten humanen Endothelzellen.

#### 4.5.1 Die Minderung des LPS-reagiblen Reportersignals ist abhängig vom Ausmaß der Rac1N17-Überexpression

Bei der flusszytometrischen Bestimmung EGFP-positiver Zellen wird nicht nur qualitativ zwischen EGFP-positiv und -negativ unterschieden, sondern die Fluoreszenzintensität des EGFP auch quantifiziert. Die Intensität der emittierten Fluoreszenz ist ein direktes Maß für die Expression von EGFP [Ducrest et al., 2002]. Die Expression von EGFP steht bei Verwendung des IRES-Vektors in festem 2,5-zu-1-Verhältnis zur Expression des Gens von Interesse [Mizuguchi et al., 2000]. Zellen stärkerer EGFP-Fluoreszenz überexprimieren also auch in stärkerem Maß das Gen von Interesse [Trouet et al., 1997]. Die Überexpression inaktiver Genvarianten kleiner GTP-bindender Proteine wird wirksam, indem die überexprimierten Proteine mit den zelleigenen funktionsfähigen Proteinen kompetitiv um Bindungspartner konkurrieren. Eine stärkere Überexpression sollte deshalb zu einer ausgeprägteren Hemmung des Signals führen. Für die Überexpression von Rac1N17 konnte die Abhängigkeit der Signalreduktion des LPS-reagiblen Reporterproteins CD25 vom Ausmaß der Überexpression gezeigt werden. Dazu wurde das Reportersignal von in FI-1 (EGFP) verschieden intensiv fluoreszierenden Zellpopulationen verglichen. Die Dot Plots der Abbildung 19 zeigen die Verschiebung des gemessenen Reportersignals in FI-4 (y-Achse) in Abhängigkeit der Fluoreszenz von EGFP in FI-1 (x-Achse). Die für die Reporterexpression repräsentative Fluoreszenzintensität in FI-4 steigt mit steigender Fluoreszenzintensität des EGFP für die Positivkontrolle (links) und fällt mit steigender Fluoreszenzintensität des EGFP für Rac1N17 (rechts). Der Anstieg der Reporterexpression mit steigender Expression von EGFP ist Ausdruck der erhöhten Reagibilität der Zelle durch die Proteinüberexpression des EGFP.

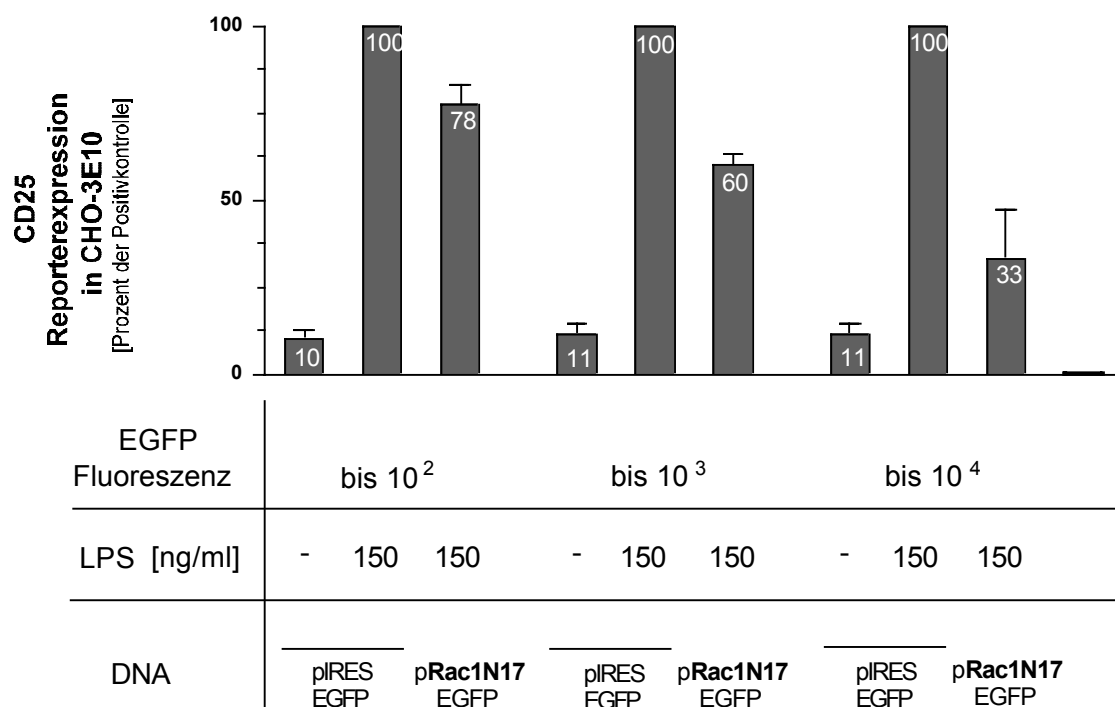
Der Abfall der Reporterexpression unter steigender Expression von Rac1N17/EGFP ist Ausdruck der blockierenden Wirkung der inaktiven Proteinvariante. Die Abhängigkeit der Reportersignalreduktion von der Stärke der Überexpression konnte nur für Rac1N17, nicht aber für RhoAN19 und Cdc42N17 gezeigt werden.



**Abb. 19: Änderung des Reportersignals in Abhängigkeit der Stärke der Überexpression**

Im linken Dot Plot LPS-stimulierte Zellen nach Transfektion von pIRES2-EGFP: entsprechend dem ansteigenden Pfeil zunehmendes Reportersignal in Fl-4 (y-Achse) mit zunehmender Überexpression von EGFP gemessen in Fl-1 (x-Achse). Im rechten Dot Plot LPS-stimulierte Zellen nach Transfektion von pRac1N17-IRES-EGFP: abnehmende Reporterexpression in Fl-4 mit zunehmender Expression von EGFP/Rac1N17.

In Abbildung 20 ist die oben in einem repräsentativen Dot Plot dargestellte Reduktion der Reporterexpression in Abhängigkeit vom Ausmaß der Überexpression von inaktivem Rac1N17 quantitativ für drei Populationen in Fl-1 (EGFP) zunehmend stark fluoreszierender Zellen dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte der Ergebnisse aus drei voneinander unabhängigen FACS-Messungen. Zunehmende Überexpression von Rac1N17 führt zu einer ausgeprägteren Abnahme des Reportersignals bis auf 33 % des Kontrollwerts für die Population stärkster Fluoreszenz.



**Abb. 20: Abfall des Reportersignals für drei Populationen steigender Überexpression von Rac1N17**

Das Reportersignal der CHO-3E10-Zellen wurde in Abhängigkeit ihrer EGFP-Fluoreszenz, d.h. in Abhängigkeit ansteigender Proteinüberexpression, dargestellt. Für jede der drei Populationen ansteigender Fluoreszenz sind jeweils die nicht stimulierte Negativkontrolle, die stimulierte Positivkontrolle, beide pIRES2-EGFP transfiziert, und der Wert für die stimulierten pRac1N17-IRES-EGFP-transfizierten Zellen angegeben. Die Positivkontrolle wurde für jede der drei Populationen jeweils gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des Mittelwerts aus drei unabhängigen FACS-Messungen.

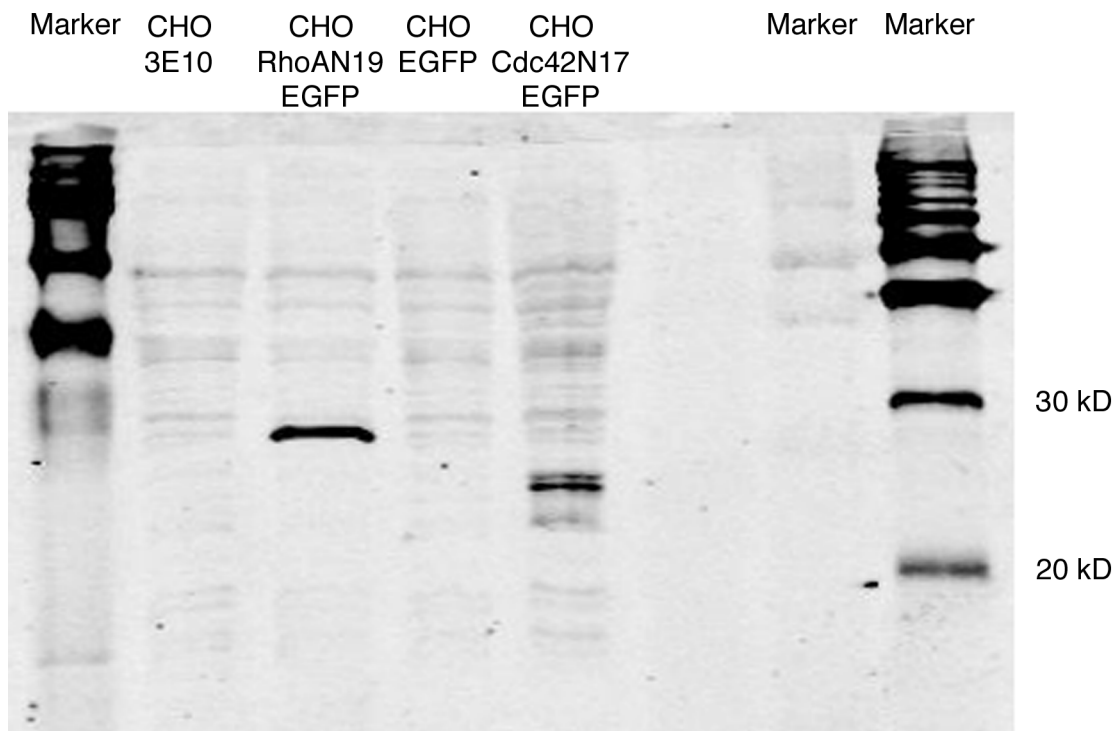


#### **4.6 Generation der stabilen Zelllinien CHO-RhoAN19 und CHO-Cdc42N17**

Die Generation stabil transformierter Zelllinien ist eine Möglichkeit, Zellen für das Studium überexprimierter Proteine zu gewinnen, die nahezu vollständig das jeweilige Gen von Interesse überexprimieren. Deshalb wurde die LPS-reagible Reporterlinie CHO-3E10 mit den Plasmiden pRhoAN19-IRES-EGFP, pRac1N17-IRES-EGFP, pCdc42N17-IRES-EGFP transfiziert, und unter Verwendung des Selektionsantibiotikums G418 wurden transformierte EGFP-positive Linien für jedes der transfizierten Plasmide selektiert. Das neben der jeweiligen inaktiven GTPase exprimierte EGFP war dabei sehr hilfreich, weil tatsächlich transformierte Zellen noch während der Selektion anhand ihrer Fluoreszenz mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops identifiziert und ausgewählt werden konnten. Von EGFP-positiven transformierten Zellen wurde die gleichzeitige Expression der jeweiligen inaktiven GTPase erwartet, weil beide Gene mit einem IRES-Vektor transfiziert wurden und die Expression der beiden Gene von einem solchen bicistronischen Expressionsvektor im allgemeinen auch in stabil transfizierten Zellen in enger Korrelation steht [Liu et al., 2000]. Allerdings werden die beiden Gene nicht als Fusionsprotein, sondern als singuläre Proteine von einer mRNA exprimiert [Mizuguchi et al., 2000]. Die inaktiven GTPasen sind innerhalb ihres Start- und Stopcodons daneben mit der Sequenz für das Myc-Epitop versehen.

##### **4.6.1 Nachweis der Expression von Myc-RhoAN19 und Myc-Cdc42N17**

Um die erwartete Expression der Myc-markierten GTPase zu verifizieren, wurde ein Western Blot zum Nachweis des Myc-Epitops durchgeführt. Der in Abbildung 21 dargestellte Blot weist die Expression des Myc-Epitops in den Linien CHO-RhoAN19 und CHO-Cdc42N17 nach, während für die EGFP-positive mit pRac1N17-IRES-EGFP transformierte Linie kein Myc-Epitop nachweisbar war. Der für die inaktive GTPase Rac1N17 codierende Sequenzabschnitt ist offensichtlich verloren gegangen.



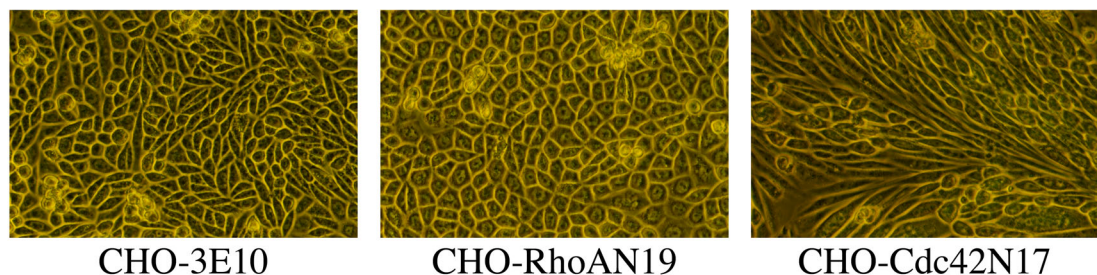
**Abb. 21: Western-Blot zum Nachweis der Myc-markierten Proteine RhoAN19 und Cdc42N17 in den Linien CHO-RhoAN19 und CHO-Cdc42N17**

Die zweite Laufbahn von links zeigt den Proteinextrakt aus Zellen der Linie CHO-3E10, die dritte Bahn von links den Extrakt aus der neu transformierten Linie CHO-RhoAN19-EGFP und die fünfte Bahn den Extrakt aus der Linie CHO-Cdc42N17-EGFP. Inkubiert wurde der Blot mit einem Antikörper gegen das Myc-Epitop. Zu sehen sind auf der Laufhöhe zwischen 20 und 30 kD die durch den Myc-Ak nachgewiesenen Banden für Myc-RhoAN19 und Myc-Cdc42N17, während in der Ursprungszelllinie CH-3E10 keine Bande nachweisbar war.

#### 4.6.2 Zytomorphologie der Linien CHO-3E10, CHO-RhoAN19 und CHO-Cdc42N17

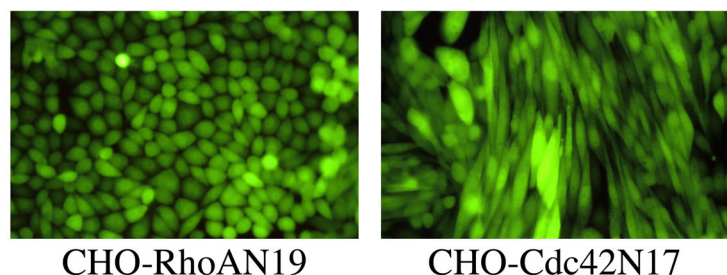
Nachdem die Expression der inaktiven GTPasen RhoAN19 und Rac1N17 in den neu transformierten Linien mittels Western Blot nachgewiesen wurde, wurde die Zytomorphologie der transformierten Linien im Vergleich zur Morphologie der Ausgangslinie CHO-3E10 als qualitativer Nachweis der *funktionellen Wirksamkeit* der exprimierten inaktiven GTPasen dokumentiert. Da die Wirkung der GTPasen auf Zytoskelett und Zellmorphologie unter anderem über die Kondensation von Aktin-Filamenten zu Stressfasern vermittelt wird, wurde anschließend ein konfokalmikroskopischer Nachweis des F-Aktins in den Linien CHO-3E10, CHO-RhoAN19 und CHO-Cdc42N17 durchgeführt. Abbildung 22 zeigt konfluente Monolayer der drei Linien in 40x phasenkontrastmikroskopischer Vergrößerung. Die Zellen der Linie CHO-RhoAN19 wirken regelmäßiger, entspannter und haben

weniger Plasmaausläufer als die Zellen der Linie CHO-3E10. Zellen der Linie CHO-Cdc42N17 wirken deutlich langgezogen und spindelförmiger als Zellen der Linien CHO-3E10 und CHO-RhoAN19. Die vergleichende Phasenkontrastmikroskopie konfluenter Monolayer zeigt: Die Expression von RhoAN19 und Cdc42N17 führt jeweils zu charakteristischen Veränderungen der Zellmorphologie gegenüber der Ursprungslinie CHO-3E10. Dieser Befund wird durch die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der EGFP-positiven Linien in 40facher Vergrößerung, die in Abbildung 23 dokumentiert ist, bestätigt.



#### **Abb. 22 : CHO-Phasenkontrastmikroskopie**

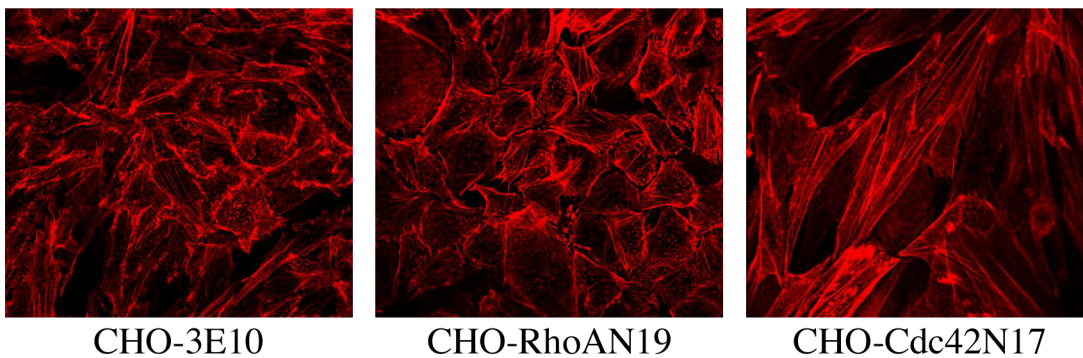
Darstellung konfluenter Monolayer der drei Zelllinien CHO-3E10, CHO-RhoAN19 und CHO-Cdc42N17. Die Aufnahmen nativer Zellen erfolgten am inversen Mikroskop Olympus IMT-2 bei 40facher Vergrößerung. Zu sehen sind rechts die leicht spindelförmigen Zellen der Linie CHO-3E10, mittig die entspannten, kopfsteinpflasterartigen Zellen der Linie CHO-RhoAN19 und links die langgestreckten Zellen der Linie CHO-Cdc42N17.



#### **Abb. 23 : CHO-Fluoreszenzmikroskopie**

Darstellung konfluenter Monolayer der zwei Zelllinien CHO-RhoAN19 und CHO-Cdc42N17. Die Aufnahmen nativer Zellen erfolgten am inversen Mikroskop Olympus IMT-2 bei 40facher Vergrößerung mit einem FITC-geeigneten Filterset. Zu sehen sind rechts die entspannten, eher rundlichen Zellen der Linie CHO-RhoAN19 mit deutlichen Interzellularspalten und links die langgestreckten Zellen der Linie CHO-Cdc42N17 mit ausgeprägtem Zell-Zell-Kontakt. Die Ausgangslinie CHO-3E10 ist mangels Expression von EGFP nicht dargestellt.

Abbildung 24 zeigt die konfokalmikroskopische Darstellung des F-Aktins in den drei Zelllinien. Die Linie CHO-3E10 zeigt Aktinfilamente im Zellleib und aktinpositive Zellgrenzen mit engen Zell-Zell-Kontakten. Zellen der Linie CHO-RhoAN19 zeigen dagegen einen entspannten Zellleib mit wenigen Aktinfilamenten, weniger aktinpositive Zellgrenzen und weniger enge Zell-Zell-Kontakte. Zellen der Linie CHO-Cdc42N17 sind spindelförmig gespannt und zeigen dicke langgestreckte Aktinfilamente, welche die gesamte Zelle ihrer Länge nach queren.



#### **Abb. 24: CHO-Konfokalmikroskopie**

Darstellung konfluenter Monolayer der drei Linien CHO-3E10, CHO-RhoAN19 und CHO-Cdc42N17 nach Anfärben des F-Aktins mit fluoreszenzkonjugiertem Phalloidin. Die Aufnahmen fixierter Zellen erfolgten am Konfokalmikroskop Zeiss Axioskop2 LSM 5 Pascal bei 63facher Vergrößerung. Zu sehen sind neben der Linie CHO-3E10 entspannte stressfaserarme Zellen der Linie CHO-RhoAN19 und gespannte Zellen mit ausgeprägten Stressfasern der Linie CHO-Cdc42N17.

Mit den phasenkontrast-, fluoreszenz- und konfokalmikroskopischen Ergebnissen wurde für die neu generierten Zelllinien CHO-RhoAN19 und CHO-Cdc42N17 neben der Expression der jeweiligen inaktiven GTPase also auch die funktionelle Auswirkung der Überexpression der inaktiven GTPasen anhand der spezifischen Veränderungen des Zytoskeletts und der Kondensation von Aktinfilamenten nachgewiesen.

## 5 Diskussion

In dieser Dissertation wurde gezeigt, dass inaktive Mutanten der Rho-GTPasen RhoA, Rac1, Cdc42 die LPS-induzierte Expression von IL-8/CXCL8 in humanen Endothelzellen inhibieren. Zu diesem Zweck wurde für diese Arbeit die Methode der GFP-assoziierten Flusszytometrie etabliert, welche die Messung von intrazellulärem IL-8/CXCL8 in transfizierten Endothelzellen trotz niedriger Effizienzen bei der Transfektion erlaubt. Nach dem gleichen methodischen Grundprinzip der GFP-assoziierten Flusszytometrie wurde auch die Wirkung der Überexpression von RhoAN19, Rac1N17, Cdc42N17 auf die LPS-stimulierte Reporterexpression in der LPS-reagiblen Reporterlinie CHO-3E10 untersucht. Deshalb werden unter 5.1 und 5.2 zunächst die Überexpression inaktiver Mutanten kleiner GTP-bindender Proteine und die GFP-assoziierte Identifikation transfizierter Zellen als zentrale in dieser Arbeit verwendete Methoden diskutiert. Unter 5.3–5.6 wird dann auf die einzelnen gezeigten Ergebnisse eingegangen.

### 5.1 Methodik der Überexpression inaktiver Mutanten GTP-bindender Proteine

Bisher wurden zum Studium der zellulären Funktionen kleiner GTP-bindender Proteine zwei experimentelle Ansätze verwandt, die Modifikation ihrer Funktion durch bakterielle Toxine oder wie in dieser Arbeit die Überexpression aktivitätsverändernder Mutanten. Ihr wird allgemein eine hohe Spezifität zugeschrieben [Qiu et al., 1997]. Um die Spezifität inaktiver Mutanten zu beurteilen, ist es notwendig, den speziellen Mechanismus, über den sie inaktivierend wirken, zu kennen. Die inaktiven Mutanten der Rho-Familie leiten sich direkt von den inaktiven Mutanten der Ras-Familie ab. Aus dem Studium der onkogenetischen Eigenschaften von Ras waren primär die *aktivierenden* Mutationen in Codon 12, 13 oder 61 bekannt, die dem mutierten Gen seine transformatorische Eigenschaft verleihen [Feig et al., 1987]. Die erste Gruppe *inhibitorischer* Ras-Mutanten wurde 1988 durch Studien der Zufallsmutagenese am HaRas-Gen etabliert [Feig und Cooper, 1988]. Später wurden inaktive Varianten anderer GTP-bindender Proteine konstruiert, indem die in Ras als inaktivierend identifizierte Mutation an der korrespondierenden Stelle in den anderen GTP-bindenden Proteinen, darunter RhoA, Rac1 und Cdc42, erzeugt

wurde [Ridley et al., 1992; Self und Hall, 1995]. Die entsprechenden Sequenzabschnitte stimmen in den genannten GTPasen weitgehend überein und die Aminosäuresequenzen sind einander homolog (Abb. 3, Seite 15). Als inaktivierend wurden Substitutionen an den Aminosäurepositionen 15, 16 und 17 in HaRas identifiziert, von denen die Mutante Ras S17N am häufigsten eingesetzt wurde [Feig und Cooper, 1988]. Ihr entsprechen die Mutationen Rac1/Cdc42 T17N und RhoA T19N. Die negativen Mutanten konkurrieren in der Zelle kompetitiv mit ihrem jeweiligen Wildtyp um die Bindung von GEFs, wobei die Mutanten auch nach Bindung eines GDP oder sogar eines GTP keinen Effektor aktivieren können. Röntgenkristallographische Analysen von Ras deuten darauf hin, dass die Bindung von Magnesium-Ionen an Serin17 eine notwendige Voraussetzung für den Wechsel in die aktive Konformation ist und die reduzierte Bindung von  $Mg^{2+}$ -Ionen in den 17N-Mutanten ursächlich für deren Unfähigkeit zur Aktivierung von Effektoren ist [Feig, 1999]. Da die Mutanten eine höhere Affinität zu ihren GEFs aufweisen als der jeweilige Wildtyp und die Mutante überexprimiert wird, wird der physiologische Wildtyp der GTPase weniger oder kaum aktiviert. Bemerkenswert bezüglich der Spezifität der eingesetzten negativen Mutanten ist also, dass diese nicht inhibitorisch wirken, indem sie direkt mit ihrem zellulären Wildtyp interferieren, wie dies unter anderem bei inhibitorischen Mutanten von Rezeptor-Tyrosinkinasen oder Transkriptionsfaktoren der Fall ist, sondern indem sie den flussaufwärts stehenden aktivierenden GEF binden [Feig, 1999]. Theoretisch wäre Spezifität für eine einzelne GTPase dann nur gegeben, wenn ein GEF nur eine einzelne spezifische GTPase aktiviert, aber tatsächlich aktivieren einige GEFs *in vitro* mehrere verschiedene GTPasen [Zheng et al., 1995]. Es könnte von einer negativen Mutante aus der Rho-Familie also angenommen werden, sie inhibiere auch nahe verwandte Familienmitglieder. Tatsächlich belegen experimentelle Daten aber, dass der Einsatz negativer Mutanten aus der Rho-Familie zu sehr spezifischen Phänotypen führt, und es ist allgemein anerkannt, dass die Expression negativer Mutanten von kleinen GTP-bindenden Proteinen hochspezifisch für die einzelne GTPase ist [Bishop und Hall, 2000; Feig, 1999; Qiu et al., 1997]. So wurden in den vergangenen zehn Jahren über sechshundert Veröffentlichungen zu negativen Mutanten von Ras und mehr als zweihundert Veröffentlichungen zu analogen negativen Mutanten anderer Mitglieder der Ras-Superfamilie publiziert. Der beschriebene Mechanismus, über den inaktive

Mutanten der Rho-Familie wirksam werden, sollte jedoch bedacht und die auf diesem Weg gewonnenen Ergebnisse mit anderen Methoden, etwa der Anwendung kurzer interferierender RNA (siRNA), bestätigt werden.

## **5.2 Methoden zur Identifikation der transfizierten Subpopulation**

Die Transfektionseffizienzen, die beim Gentransfer in Endothelzellen und andere hoch differenzierte humane Zelltypen mit Transfektionsreagenzien erreicht werden, sind mit 0,1–10 % sehr gering [Martin und Murray, 2000]. Für die humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie wurde damit übereinstimmend eine Effizienz im niedrigen einstelligen Prozentbereich erreicht. Um spezifische Parameter, die von der Überexpression eines transfizierten Gens abhängig sind, zu messen, ist deshalb die separate Analyse der transfizierten Subpopulation notwendig. Chen hat zu diesem Zweck in der Untersuchung von RhoA in der LPS-induzierten Expression von IL-8/CXCL8 in Monozyten die Methode der magnetkügelchen-assoziierten Zellsortierung eingesetzt [Chen et al., 2003]. Bei dieser Methode wird mit dem Gen von Interesse ein Expressionsvektor für ein Oberflächenantigen kotransfiziert. Zellen, die das Oberflächenantigen exprimieren, werden dann durch Bindung an einen magnetkügelchengekoppelten Antikörper selektiert und stehen für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Die Methode eignet sich besonders für Zellen, die in Suspension kultiviert werden, weil die Zellen für das magnetkügelchenbasierte Sortieren suspendiert sein müssen. Die Endothelzellen müssten für diese Methodik nicht nur trypsinisiert und für den Zeitraum des Sortierens suspendiert werden, sondern auch in hinreichender Anzahl für einen Elisa aus dem Überstand erneut ausplattiert und kultiviert werden. Bei der niedrigen Transfektionseffizienz und der Empfindlichkeit der Endothelzellen erscheint dieses Verfahren schwer durchführbar.

Das Grundprinzip der GFP-assoziierten intrazellulären Bestimmung von IL-8/CXCL8 ist die gleichzeitige Transfektion der für das Grüne Fluoreszenzprotein (GFP) codierenden DNA mit dem Gen von Interesse, wobei das GFP Reporter für die erfolgreiche Transfektion ist [Trouet et al., 1997]. Die Zellen werden dann durch die flusszytometrische Zellsortierung anhand der Fluoreszenz des GFP sortiert und in einem Arbeitsgang nach vorheriger intrazellulärer Färbung IL-8/CXCL8 gemessen [Jung et al., 1993]. Diese Methode ermöglicht über die Sortierung transfizierter Zellen mit Hilfe des Flusszytometers hinaus die

kontinuierliche Beobachtung der Expression von GFP vitaler transfizierter Zellen im Fluoreszenzmikroskop. Damit erlaubt dieses Reportersystem nicht nur die Selektion transfizierter Zellen, sondern gibt zusätzlich Informationen über die Transfektionseffizienz, den zeitlichen Verlauf der Überexpression und die morphologischen Veränderungen durch das kotransfizierte Gen von Interesse.

#### 5.2.1 Intrazelluläre IL-8/CXCL8-Messung versus ELISA aus dem Überstand

Verschiedene Proteine der Rho-Familie stehen auch in Signalwegen, die Zellzyklus, Proliferation und Apoptose beeinflussen [Jaffe und Hall, 2002]. So wurde unter Verwendung inaktivierender Toxine auch für humane Endothelzellen eine Bedeutung GTP-bindender Proteine der Rho-Familie in der Apoptose gezeigt [Hippenstiel et al., 2002a]. Für einen Zytokinelisa aus dem Überstand wirft das selbst bei hinreichender Effektivität des DNA-Transfers das Problem auf, dass unterschiedliche Messwerte nicht nur durch die unterschiedliche Expression von IL-8/CXCL8 beeinflusst werden, sondern auch durch aufgrund von Proliferation und Apoptose variierende Zellzahlen. Die in dieser Arbeit angewandte intrazelluläre Messung in nachweislich transfizierten Zellen schließt dieses Problem aus, denn aus jeder Probe wurde die gleiche Anzahl transfizierter Zellen (5000 Zellen) gemessen. Gerade in Bezug auf den quantitativen Vergleich der IL-8/CXCL8-Expression nach Transfektion von RhoAN19, Rac1N17 und Cdc42N17 ist die angewandte Methode der intrazellulären Messung deshalb der magnetischen Zellsortierung und anschließender Stimulation mit Messung im Überstand überlegen.

#### 5.2.2 Andere Reporter der Transfektion bei flusszytometrischer Bestimmung

Alternativ zur Kotransfektion der GFP-DNA als Reporter der Transfektion ist die Identifikation transfizierter Zellen über die Antikörperbindung des Myc-Epitops der untersuchten GTP-bindenden Proteine denkbar. Dann müssten die Endothelzellen nach Fixierung und Permeabilisierung mit Antikörpern gegen IL-8/CXCL8 *und* gegen das Myc-Epitop behandelt werden. In dieser Arbeit wurde diese Methodik aus verschiedenen Gründen nicht gewählt. Zunächst entfielen die oben genannte kontinuierliche Beobachtung der Überexpression in vitalen Zellen. Darüber hinaus hätte es zunächst keine korrekten Positiv- und Negativkontrollen gegeben, denn der pRK5-Leervektor codiert *nicht* für das Myc-Peptid. Die Myc-Sequenz wurde



erst bei der Konstruktion der pRK5-Expressionsvektoren für die Rho-Mutanten gemeinsam mit diesen eingefügt. Ein Ausschneiden der kompletten für die Mutanten codierenden Sequenz unter Erhalt des Leserahmens für die Myc-Sequenz war mangels passender Restriktionsendonukleasen nicht möglich. Mit dem pRK5-Leervektor transfizierte Zellen wären also nicht zu detektieren gewesen. Für alle Transfektionsexperimente ist aber von wesentlicher methodischer Bedeutung, dass als Kontrollen – in diesem Fall also nicht stimulierte und LPS-stimulierte Zellen ohne Überexpression einer inaktiven GTPase – ebenfalls transfizierte Zellen verwendet werden. Denn denkbar ist, dass allein der Transfer von Fremd-DNA und die Überexpression eines Proteins die Zelle aktivieren und die basale Produktion von Zytokinen/Chemokinen sowie die Reagibilität auf Stimuli erhöhen können. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit als Kontrollen zu den mit inaktiven GTPasen transfizierten Zellen ebenfalls GFP-positive transfizierte Zellen gemessen. Die Identifikation transfizierter Zellen über das Myc-Epitop in dieser Arbeit war auch nicht möglich, weil Antikörper für das exprimierte Epitop (Myc-Epitop; Ak-Klon: 9E10) wie auch Antikörper gegen humanes IL-8/CXCL-8, die für intrazelluläre Anwendung geeignet sind, nur aus dem gleichen Tier zur Verfügung standen, so dass eine getrennte flusszytometrische Bestimmung über sekundäre fluoreszenzkonjugierte Antikörper nicht möglich gewesen wäre. Direkt fluoreszenzkonjugierte Primärantikörper gegen IL-8/CXCL8 für die Messung *in Fl-4* standen ebenfalls nicht zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde neben der intrazellulären IL-8/CXCL8-Bestimmung aber auch das Oberflächenantigen CD25 als LPS-reagibler Reporter in der Linie CHO-3E10 flusszytometrisch bestimmt, und hier hätte eine Identifikation transfizierter Zellen über das Myc-Epitop eine Permeabilisierung und damit Fixierung der Zellen erfordert. Unter Verwendung des GFP als Reporter der Transfektion konnten vitale Zellen gemessen werden, was eine optimale Schonung der quantitativ zu messenden Oberflächenantigene ermöglicht.

### 5.2.3 Detektion GFP-positiver Zellen in den Kanälen FI-1 bis FI-4 des Facscalibur

Unter Verwendung des GFP als Reporter der Transfektion ist, wie unter 4.3 gezeigt wurde, die flusszytometrische Messung eines weiteren Parameters in Endothel- und CHO-Zellen am Facscalibur aufgrund der Breite des Emissionsspektrums intrazellulär lokalisierten GFPs nur in Fluoreszenz-4 (FI-4) möglich. Die in dieser Arbeit verwendeten GFP-Mutanten basieren beide auf der von Heim beschriebenen S65T-Mutante [Heim et al., 1995]. Ihre Anregungs- und Emissionsspektren sind gegenüber dem Wildtyp-GFP nach rechts verschoben und ihre Spitzen liegen etwa bei  $\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$  und  $\lambda_{em} = 505 \text{ nm}$  [Diamond und De Maggio, 2000]. Sie sind damit für übliche Filtersysteme, die der Detektion von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) dienen, optimiert. Tatsächlich geben mit pGreenLantern1 und pIRES2-EGFP transfizierte Endothel- oder CHO-Zellen nach Anregung bei 488 nm wie erwartet ein intensives Signal im Kanal FI-1 (530/30 nm Bandpassfilter) des Facscalibur. Allerdings emittieren GFP-positive Zellen auch im Kanal FI-2 (585/42 nm Bandpassfilter) und im Kanal FI-3 (670 nm Langpassfilter) des Facscalibur. Abbildung 12 auf Seite 64 zeigt im linken Dot Plot, dass aufgrund der mit der Fluoreszenzintensität in FI-1 linear ansteigenden Intensität in FI-2 keine elektronische Kompensation dieser GFP-assoziierten Fluoreszenz möglich ist. Der in dieser Arbeit für Endothel- und CHO-Zellen gezeigte Sachverhalt wird auch von Ducrest in einer Veröffentlichung über die Verwendung von destabilisiertem GFP als Reporter der Promotoraktivität in humanen Lungenfibroblasten (HLF) beschrieben [Ducrest et al., 2002]. Die Bestimmung eines weiteren Parameters ist allerdings in FI-4 (661/16 Bandpass) möglich, wie der rechte Dot Plot in Abb. 12 auf Seite 64 rechts zeigt. Der Bandpassfilter in FI-4 ist sehr schmal und die Fluoreszenzintensität der hier detektierten Farbstoffe Cyanin 5 (Cy5) und Allophycocyanin (APC) ist genau in diesem schmalen Bandbereich sehr hoch. Demgegenüber ist eine GFP-induzierte Fluoreszenz in diesem Kanal nicht messbar. Aus diesem Grund wurde sowohl IL-8/CXCL8 als auch das LPS-reagible Reporter-Oberflächenprotein CD25 in FI-4 mit Hilfe Cy5- bzw. APC-konjugierter Antikörper gemessen. Beide Fluoreszenzfarbstoffe werden durch einen zweiten Laser mit 635 nm angeregt. Während für das Reporterprotein CD25 ein APC-konjugierter Primärantikörper zur Verfügung stand, musste für den intrazellulären IL-8/CXCL8-Nachweis eine Kombination aus primärem und

sekundärem Cy5- konjugiertem Antikörper eingesetzt werden.

#### 5.2.4 Verhältnis zwischen GFP und Gen von Interesse bei der Überexpression

Für die Transfektion von Endothelzellen und CHO-Zellen in dieser Arbeit galt: Um eine Identifikation transfizierter Zellen anhand ihrer GFP-Expression zu ermöglichen, musste eine Mindestmenge an Fluoreszenzprotein exprimiert werden, welche die Detektion durch das Facscalibur ermöglicht. Diese Menge ist unter anderem abhängig von der GFP-Variante und liegt für die Expression von EGFP in HeLa-Zellen bei ~30 nM [Diamond und De Maggio, 2000]. Außerdem sollte die Expression des Gens von Interesse möglichst hoch sein, um eine maximale Überexpression im Verhältnis zum korrespondierenden zelleigenen nicht mutierten Gen zu bewirken. Für die Zellen der Linie CHO-3E10 wurde diese Forderung durch die Plasmide pRhoAN19-IRES-EGFP, pRac1-IRES-EGFP und pCdc42N17-IRES-EGFP optimal erfüllt. Die in diesen bicistronischen Expressionsvektoren vorhandene IRES-Sequenz codiert für eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), eine Sequenz die primär in verschiedenen Viren nachgewiesen wurde. Diese erlaubt die cap-unabhängige Translation, das heißt, das Ribosom bindet die mRNA am Startcodon unabhängig von der 5'-wärts gelegenen unübersetzten Region [Mountford und Smith, 1995]. Für die in dieser Arbeit hergestellten Derivate des pIRES2-EGFP-Vektors bedeutet das: Unter einem Promotor werden zwei singuläre Proteine von einem mRNA-Transkript exprimiert. Das Verhältnis der Expression zwischen Protein 1 und 2 in einem IRES-Vektor (pGen1-IRES-Gen2) liegt je nach Zelltyp, exprimierten Protein, IRES-Element und Vorhandensein einer Kozak-Sequenz bei ungefähr 70 : 30 [Mizuguchi et al., 2000]. Damit ist für jede GFP-positive CHO-Zelle eine deutlich stärkere Expression des zu untersuchenden Gens von Interesse garantiert. Darüber hinaus ermöglicht das feste Expressionsverhältnis dieser bicistronischen Vektoren die Expression des Gens von Interesse anhand der Intensität der GFP-Fluoreszenz zu quantifizieren [Trouet et al., 1997]. Leider konnten die IRES-Vektoren nicht in der Untersuchung des Signalweges in Endothelzellen eingesetzt werden, weil in diesen Zellen die Expression von GFP von den Vektoren pRac1-IRES-EGFP und pCdc42N17-IRES-EGFP nicht ausreichend für eine Detektion mit Fluoreszenzmikroskop oder Flusszytometer war. Deshalb wurde bei der Transfektion der Endothelzellen eine Mischung aus pRK5-GTPase-Expressionsvektor und GFP-Expressionsvektor pGreenLantern1 im Verhältnis

50 : 50 eingesetzt. Mit dieser klassischen Kotransfektion konnte eine für die Detektion ausreichende Menge an GFP exprimiert werden. Dabei ist zu bedenken, dass eine größere Menge an transfizierter Mutante auch eine stärkere Überexpression im Verhältnis zum nicht mutierten zellulären Gen bewirkt. Das heißt, die in dieser Arbeit gemessenen Abnahmen in der IL-8/CXCL8- Expression spiegeln die physiologische Bedeutung der GTPasen für die Expression von IL-8/ CXCL8 möglicherweise eher unzureichend wider. Die Etablierung eines adenoviralen Vektorsystems, das auf die Koexpression von GFP verzichten kann, könnte quantitativ ausgeprägtere Ergebnisse liefern.

### **5.3 Zytomorphologie nach Überexpression von RhoAN19, Rac1N17, Cdc42N17**

Die zytomorphologischen Effekte der Rho-GTPasen waren ihre ersten durch Mikroinjektion der C3-Transferase von *Clostridium botulinum* studierten Wirkungen [Chardin et al., 1989]. Im Rahmen dieser Arbeit, die primär die Bedeutung für den inflammatorischen Signalweg untersucht hat, wurden deshalb auch die zytomorphologischen Wirkungen nach Überexpression von RhoAN19, Rac1N17 und Cdc42N17 fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. Während für transfizierte CHO-Zellen für jede der Mutanten eine charakteristische Zellmorphologie gezeigt werden konnte, war eine solche für die transfizierten Endothelzellen nicht nachweisbar. Bei einem Vergleich der hier gezeigten Ergebnisse mit der Literatur ist zu berücksichtigen, dass die in der Literatur beschriebenen Effekte sich zumeist auf in fibroblastären Zellen *immunfluoreszenzmikroskopisch* nachgewiesene *zelluläre Substrukturen* wie Aktinfilamente beziehen [Ridley und Hall, 1992; Ridley et al., 1992], wohingegen diese Arbeit *Übersichtsaufnahmen* transfizierter Zellen zeigt. Hinzu kommt, dass die meisten der in der Literatur dokumentierten Effekte Minuten bis Stunden nach der Mikroinjektion von rekombinanten *aktiven* Proteinvarianten, rekombinanten *Wildtyp*proteinen oder Toxinen auftraten [Ridley et al., 1992]. Die Literatur zusammengefasst, induziert RhoA die Zellkontraktion durch Induktion von Stressfasern, während Rac1 und Cdc42 die Zellextension vermitteln [van Nieuw Amerongen und van Hinsbergh, 2001]. Die in dieser Arbeit in Abbildung 10 gezeigten Effekte 24 Stunden nach Transfektion der fibroblastenartigen CHO-Zellen stimmen damit gut überein. Für porcine aortale Endothelzellen beschreibt Aspenstrom nach Transfektion *aktiver* Mutanten von

RhoA, Rac1, Cdc42 eine kleine abgerundete Zellform [Aspenstrom et al., 2003]. Die in dieser Arbeit nach Transfektion inaktiver Mutanten dargestellten Endothelzellen in Abbildung 9 zeigen eine der Kontrolle entsprechende große Zellform mit unregelmäßig begrenztem Zytoplasma, also wie zu erwarten eine gegenteilige Morphologie. Dass sich in den *Übersichtsaufnahmen* keine unterschiedliche Morphologie für die Überexpression zwischen den drei einzelnen GTPasen in Zellen des endothelialen Typs zeigen ließ, entspricht also den von Aspenstrom für transfizierte Endothelzellen berichteten Ergebnissen. Die diesbezüglichen Unterschiede zwischen fibroblastären und endothelialen Zellen lassen sich durch Unterschiede in der Proteinexpression gut erklären. Während CHO-Zellen nach Transfektion von GFP eine starke grüne Fluoreszenz aufweisen, ist die Fluoreszenz GFP-transfizierter Endothelzellen als Ausdruck einer geringeren Proteinexpression eher schwächer und für die Induktion von Effekten in der Übersichtsaufnahme nicht hinreichend.

#### **5.4 Überexpression von RhoAN19, Rac1N17, Cdc42N17 in humanen Endothelzellen**

Diese Arbeit hat gezeigt, dass die LPS-induzierte Expression von IL-8/CXCL8 in humanen Endothelzellen durch Überexpression der inaktiven Mutanten von RhoA, Rac1 und Cdc42 inhibiert wird. Damit konnten vorhergehende Ergebnisse über die LPS-induzierte IL-8/CXCL8-Expression, die unter Verwendung der Toxine TcdB-10463 und TcdB-1470 aus *Clostridium difficile* gewonnen wurden, bestätigt und konkretisiert werden. Während mit Hilfe der inaktivierenden Toxine gezeigt wurde, dass zumindest Rac1 und/oder Cdc42 in der Signaltransduktion beteiligt sein müssen [Hippenstiel et al., 2000], konnte diese Arbeit mit Hilfe der inaktiven Varianten nachweisen, dass alle drei Proteine beteiligt sind. Neben dieser und der Arbeit von Hippenstiel haben keine weiteren veröffentlichten Arbeiten die Beteiligung kleiner GTP-bindender Proteine in der LPS-induzierten Signaltransduktion in *Endothelzellen* untersucht. Allerdings wurde in einer Publikation aus dem Jahr 2002 die Beteiligung von RhoA in der LPS-induzierten Expression von IL-8/CXCL8 in monozytären Zellen nachgewiesen [Chen et al., 2002]. Damit wurde für Monozyten und Endothelzellen übereinstimmend eine Beteiligung von RhoA in der LPS-induzierten IL-8/CXCL8-Expression gezeigt. Die Proteine Rac1 und Cdc42 wurden in der Arbeit von Chen nicht untersucht, aber eine 2003 veröffentlichte Arbeit konnte die LPS-induzierte Aktivierung von Rac1 in der

monozytären Zelllinie THP-1 mit Hilfe des Rac-Aktivitätsassay nachweisen [Patel und Corbett, 2003]. Die vorgenannte Arbeit untersuchte allerdings nicht die Wirkung auf die Proteinexpression oder die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, aber die hier vorgestellten Endothelzellergebnisse legen nahe, dass auch in Monozyten neben RhoA die Proteine Rac1 und Cdc42 im LPS-induzierten Signalweg stehen.

Die Beteiligung von GTP-bindenden Proteinen in Signalwegen zur Expressionskontrolle proinflammatorischer Zytokine wurde in weiteren Arbeiten für andere Stimuli untersucht, die ihr Signal nicht wie LPS über den TLR-4-Rezeptor transduzieren. So wurde unter Verwendung inhibierender Toxine gezeigt, dass die durch TNF- $\alpha$  induzierte Expression von IL-8/CXCL8 in Endothelzellen RhoA-abhängig ist [Hippenstiel et al., 2002b].

Das Neuropeptid Substanz P (SP) wirkt als Induktor gastrointestinaler Inflammation, der die IL-8/CXCL8-Expression in epithelialen Zellen der Linie NCM460 nach Transfektion mit dem SP-Rezeptor NK-R1 induziert. Die SP-induzierte IL-8/CXCL8-Expression konnte durch Überexpression von RhoAN19, Rac1N17 und Cdc42N17 mit Hilfe eines retroviralen Vektorsystems je nach transfizierter Mutante um 30–40 % reduziert werden [Zhao et al., 2002]. Das proinflammatorisch wirksame intestinale Neuropeptid Neurotensin (NT) ist ein weiterer Mediator gastrointestinaler Inflammation und erhöht die Expression von IL-8/CXCL8 in Zellen der aus Colonmukosa abstammenden humanen epithelialen Zelllinie NCM460, die mit dem Neurotensinrezeptor NTR-1 transfiziert wurde. Auch die NT-induzierte IL-8/CXCL8-Expression in NTR-1-transfizierten Zellen der Linie NCM460 konnte durch Überexpression von RhoAN19, Rac1N17 und Cdc42N17 jeweils um etwa 40 % vermindert werden [Zhao et al., 2003]. Die Experimente mit SP- und NT-stimulierten Colonepithelzellen zeigen eine stärkere quantitative Minderung der IL-8/CXCL8-Expression nach Überexpression von RhoAN19, Rac1N17 und Cdc42N17 als die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente mit LPS-stimulierten Endothelzellen. Wenn auch stimulus- und zelltypspezifische Besonderheiten zu diesem Unterschied beitragen können, ist ein Grund möglicherweise die Verwendung des retroviralen Transfersystems und eine dadurch bedingte stärkere Überexpression der inaktiven Mutanten von RhoA/Rac1/Cdc42, denn die Koexpression eines GFP fällt weg.

### **5.5 Überexpression von Rac1N17 und Cdc42N17, aber nicht von RhoAN19 reduziert die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in HPMEC-ST1.6R**

Wie bereits unter 1.4.4 erläutert, weist die Verstärkerregion des Gens für IL-8/CXCL8 Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, C/EBP- $\beta$  und AP-1, auf [Kunsch et al., 1994]. Die zell- und stimulusspezifische Regulation der Genexpression wird durch ein Zusammenwirken der verschiedenen Transkriptionsfaktoren erreicht, wobei dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B für die Transkription von IL-8/CXCL-8 besondere Bedeutung zukommt. Diese Arbeit zeigte unter Verwendung des Reporterplasmids pGL3.BG.6 $\kappa$ B die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Rac1N17 und Cdc42N17, aber nicht durch RhoAN19, obwohl die Zytokinexpression auch durch RhoAN19 vermindert wurde. In der Arbeit von Hippenstiel wurden die LPS-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B und deren Inhibition durch TcdB-10463 mit Hilfe desselben Reporterplasmids pGL3.BG.6 $\kappa$ B nachgewiesen [Hippenstiel et al., 2000]. Die ausbleibende Hemmung der LPS-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung unter RhoAN19 lässt sich mit den von Hippenstiel berichteten Ergebnissen der Hemmung durch Toxin TcdB10463 vereinbaren, da das Toxin auch Rac1 und Cdc42 inhibiert. Trotzdem stellt sich die Frage, wie die Überexpression von RhoAN19 die unter 4.3 gezeigte Minderung der Proteinexpression von IL-8/CXCL8 bewirkt, ohne die NF- $\kappa$ B-abhängige Luziferaseaktivität zu beeinflussen.

In der Sequenz der IL-8/CXCL8-Verstärkerregion liegt unmittelbar neben der Bindungsstelle für NF- $\kappa$ B eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor C/EBP- $\beta$ , und die Mutation jeweils einer der beiden Bindungsstellen reduzierte in Zellen der Linien Jurkat T und Caco-2 die Promotoraktivität [Kunsch et al., 1994; Wu et al., 1997]. Mutation der Bindungsstelle für NF- $\kappa$ B reduzierte das IL-1 $\beta$ -stimulierte Reportersignal in Caco-2-Zellen gegenüber der Wildtypsequenz auf 1 % und Mutation der Bindungsstelle für C/EBP- $\beta$  reduzierte das Reportersignal auf 11 % [Wu et al., 1997]. Weiter wurde von Wu und Kunsch gezeigt, dass p65 und C/EBP- $\beta$  in der Transaktivierung von IL-8/CXCL8 in Zellen der Linien Caco-2 und Jurkat unmittelbar miteinander wechselwirken [Kunsch et al., 1994]. Das synergistische Wirken verschiedener Transkriptionsfaktoren im IL-8/CXCL8-Promotor könnte die Wirkung von RhoAN19 auf die Expression des Proteins in Zellen der Linie HPMEC-ST1.6R bei fehlender Wirkung auf die Aktivität des Reporterkonstrukts für NF- $\kappa$ B erklären. Die Arbeit von Chen et al. über die LPS-

induzierte RhoA-vermittelte Induktion von IL-8/CXCL8 in Monozyten konnte die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch LPS in Monozyten mittels Gel-Retentionsanalyse (EMSA) ebenso wie die Inhibition der LPS-induzierten Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch die Transferase C3 aus *Clostridium botulinum* nachweisen. Die Autoren folgerten, dass die vermehrte IL-8/CXCL8-Expression durch eine RhoA-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B bewirkt wird [Chen et al., 2002]. Einerseits kann die berichtete Hemmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B auf zellspezifische Unterschiede in der intrazellulären Signaltransduktion in Endothelzellen und Monozyten hindeuten, andererseits ist zu bedenken, dass die Transferase C3 von *Clostridium botulinum* nach neueren Erkenntnissen auch in Wechselwirkung mit der GTPase RalA tritt und die Inhibition der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch die Transferase C3 nicht mehr als RhoA-spezifisch betrachtet werden kann [Wilde et al., 2002]. Die Wirkung von RhoAN19 auf die Expression eines NF- $\kappa$ B-spezifischen Reporterkonstruktes, wie sie in dieser Arbeit getestet wurde, ist von Chen et al. nicht untersucht worden.

Weitere Arbeiten haben die Wirkung der Überexpression von Rho-Mutanten auf NF- $\kappa$ B-abhängige Reporterkonstrukte untersucht. Perona zeigte 1996, dass die Überexpression des *Wildtyps* von RhoA, Rac1 und Cdc42 und *aktiver* Mutanten der jeweiligen Gene in Zellen der Linien COS-7, NIH-3T3 und Jurkat jeweils das kotransfizierte NF- $\kappa$ B-abhängige Reporterkonstrukt HIV-Luc aktiviert. Außerdem wurde gezeigt, dass die inaktiven Mutanten Cdc42N17 und RhoAN19, aber nicht Rac1N17 die durch TNF- $\alpha$  induzierte Luziferaseexpression des Reporterkonstruktes HIV-Luc in COS-7-Zellen vermindern [Perona et al., 1997]. Einerseits wurden von Perona andere Zelllinien verwandt und überwiegend aktive Varianten ohne Stimulus überexprimiert, andererseits wurde auch ein anderes Reporterkonstrukt verwandt. Der von Perona eingesetzte Reporter HIV-Luc wurde 1993 von Devary aus dem Plasmid HIV-CAT generiert, indem die für die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) codierende Sequenz durch eine für die Luziferase (Luc) codierende Sequenz ersetzt wurde, wobei Verstärker- und Promotorregion erhalten blieben [Devary et al., 1993]. HIV-CAT selbst wurde 1984, also zwei Jahre vor der Erstbeschreibung von NF- $\kappa$ B durch Sen und Baltimore, von Sodroski unter dem Namen pU3R-III konstruiert, indem die gesamte Verstärker- und Promotorregion (gesamte U3- und 80 bp der R-Region aus dem LTR des HIV-Provirus, damals HTLV-III genannt) als regulatorische



Sequenz in ein CAT-Expressionsplasmid eingebaut wurde [Sodroski et al., 1984]. Tatsächlich enthält die ungefähr 450 bp lange Regulatorregion zwei Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B, aber darüber hinaus noch weitere Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren, wie 1985 von Rosen gezeigt wurde [Rosen et al., 1985]. Außerdem erfolgt die Expression der Luziferase in HIV-Luc unter dem viralen HIV-Promotor, während im Plasmid pGL3.BG.6 $\kappa$ B ein eukaryotischer  $\beta$ -Globin-Promotor Verwendung findet [Schwarzer et al., 1998]. Ein Vergleich der Ergebnisse von Perona mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die mit dem für NF- $\kappa$ B spezifischen Reporterplasmid pGL3.BG.6kB gewonnen wurden, muss die gravierenden Unterschiede der jeweils verwendeten Reporterkonstrukte berücksichtigen.

Auch in den beiden unter 5.4 zitierten Arbeiten von Zhao über die Hemmung der durch Substanz P (SP) und Neurotensin (NT) stimulierten IL-8/CXCL8-Expression durch inaktive Rho-GTPasen wurde die Wirkung der Mutanten auf die Expression eines kotransfizierten NF- $\kappa$ B-abhängigen Reporterplasmids untersucht und eine Minderung des Reportersignals unter allen drei inaktiven Mutanten gezeigt [Zhao et al., 2002; Zhao et al., 2003]. Das von Zhao in der SP-stimulierten Luziferaseexpression benutzte Reporterplasmid geht zurück auf das von A. S. Baldwin konstruierte Plasmid MHC-NF- $\kappa$ B-CAT [Baldwin et al., 1991], aus dem Mitchell 1995 durch Austausch der codierenden Sequenz für die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) gegen eine für die Luziferase (Luc) codierende Sequenz unter Beibehaltung der regulatorischen Sequenzen einen NF- $\kappa$ B-abhängigen Luziferasereporter generiert hat [Mitchell und Sugden, 1995]. Beide Plasmide weisen als regulatorisches Element ein Triplett der aus dem MHC-I-Verstärker kopierten Sequenz TGGGGATTCCCCA auf. Baldwin zeigte 1991 unter anderem mit Hilfe dieses Plasmids, dass NF- $\kappa$ B oder ein NF- $\kappa$ B-ähnlicher Faktor durch Stimulation ruhender Fibroblasten mit Serum induziert wird. In der Diskussion zu dieser Veröffentlichung weist Baldwin darauf hin, dass ein weiteres Reporterkonstrukt,  $\kappa$ B2-CAT, das eine Duplett einer sehr ähnlichen Sequenz aus der Verstärkerregion der Immunglobulin- $\kappa$ -Leichtkette enthält, sich unter gleichen Bedingungen nicht durch Serum induzieren ließ [Baldwin et al., 1991]. Das genannte Plasmid  $\kappa$ B2-CAT wurde von Pierce konstruiert und war das erste NF- $\kappa$ B-spezifische Reporterplasmid. Es enthält die Sequenz GGGACTTTCC [Pierce et al., 1988]. Diese Sequenz von 11 Nukleotiden entspricht der von Sen und Baltimore in der Erstbeschreibung von NF- $\kappa$ B angegebenen Sequenz für die

Bindungsstelle in der Verstärkerregion der Immunglobulin- $\kappa$ -Leichtkette [Sen und Baltimore, 1986]. Schon die Arbeit von Baldwin weist also nach, dass sehr ähnliche Reporterkonstrukte unterschiedliche Ergebnisse liefern können. Das in dieser Arbeit verwendete von Robert Newton konstruierte Plasmid pGL3.BG.6 $\kappa$ B enthält 6x die Bindungssequenz GGGGACTTCCCT, entsprechend der Originalsequenz aus dem  $\kappa$ B-Verstärkerelement [Schwarzer et al., 1998]. Neben der Möglichkeit stimulus- und zellspezifischer Faktoren kann eine weitere Erklärung für die verschiedenen Ergebnisse im Reporterassay zwischen LPS-stimulierten Endothelzellen und SP-stimulierten Colonepithelzellen also die Verwendung der ungleichen Reporterkonstrukte sein. Bemerkenswert ist, dass Baldwin als Kontrollplasmid zum Nachweis der Spezifität der Transkriptionsfaktorbindung ein Plasmid mit der Sequenz TGCGGATTCCCGA, also mit Mutationen von Nukleotiden in zwei getrennten Bereichen der Bindungssequenz, verwendet hat [Baldwin et al., 1991]. Die Spezifität des in dieser Arbeit verwendeten Plasmids pGL3.BG.6 $\kappa$ B wurde dagegen mit einem Plasmid der Sequenz GGCGACTTCCCT, also mit einer Mutation nur im Sequenzbereich der vier G, nachgewiesen [Schwarzer et al., 1998]. Das Gleiche gilt für das Plasmid  $\kappa$ B2-CAT mit der mutierten Sequenz ATTCAGTTTCC [Pierce et al., 1988]. Diese Vergleiche und schon die Ergebnisse von Baldwin zeigen, welche Bedeutung der genauen Bindungssequenz eines Reporterplasmids zukommt. Hinzu kommen die zum Teil erheblichen Variationen der Bindungssequenzen in der Verstärkerregion des jeweils untersuchten Gens gegenüber der Bindungssequenz des Reporters. Dementsprechend kommt der Messung des tatsächlich exprimierten Proteins die entscheidende Bedeutung zu.

Weiter ist auch denkbar, dass bei Kotransfektion von drei einzelnen Plasmiden in Endothelzellen die Normalisierung der Luziferaseaktivität durch Abgleich auf die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität nicht zuverlässig funktioniert. Denn schon bei gleichzeitiger Transfektion zweier Plasmide im Verhältnis 1:1 exprimiert eine Teilpopulationen der transfizierten Zellen von bis zu 30% nur eines der beiden Plasmide [Trouet et al., 1997]. Es erscheint deshalb sinnvoll, die Frage nach der Aktivierung von NF- $\kappa$ B nach Überexpression von RhoAN19 durch eine andere Methode zu überprüfen. Möglich wäre hier zum Beispiel der intrazelluläre Nachweis von I $\kappa$ B

nach LPS-Stimulation, der methodisch analog dem intrazellulären Nachweis von IL-8/CXCL8 durchzuführen wäre.

## **5.6 Überexpression von Rac1N17, Cdc42N17 und von RhoAN19 reduziert die Aktivierung des Reporters in CHO-3E10**

Vorhergehende Arbeiten mit anderen Stimuli in anderen Zelllinien zeigten, dass die Aktivierung der IL-8/CXCL8-Transkription neben NF- $\kappa$ B unter anderem auch durch den Transkriptionsfaktor AP-1 gesteuert wird [Wu et al., 1997]. Diese Arbeit untersuchte deshalb die Wirkung der Mutanten RhoAN19, Rac1N17 und Cdc42N17 auf die Aktivierung der LPS-reagiblen Reporterlinie CHO-3E10, deren Reporterkonstrukt ein Fragment aus der Verstärkerregion des Gens für ELAM-1/CD62E mit Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B und AP-1 enthält [Delude et al., 1998; Jensen und Whitehead, 2003].

### **5.6.1 Die Reporterexpression in CHO-3E10 zeigt das gleiche quantitative Muster wie die Expression von IL-8/CXCL8 in Endothelzellen**

Rac1N17 und Cdc42N17 inhibieren die Expression des Reporterproteins in CHO-3E10, wie auch die Expression der Luziferase im für NF- $\kappa$ B-*spezifischen* Reportersystem pGL3.BG.6 $\kappa$ B in Endothelzellen. Die Mutante RhoAN19 inhibiert den LPS-reagiblen Reporter der Linie CHO-3E10 ebenfalls, genau wie auch die Proteinexpression von IL-8/CXCL8 in Endothelzellen, obwohl keine inhibierende Wirkung auf den für NF- $\kappa$ B *spezifischen* Reporter vorhanden war. Zunächst ist zu bedenken, dass die zwei Reportersysteme in verschiedenen Zelllinien genutzt wurden und ein Unterschied in der Hemmung der LPS-induzierten Aktivierung auf zellspezifischen Unterschieden in der LPS-induzierten Signaltransduktion zwischen Endothel- und CHO-Zellen beruhen kann. Da aber schon für die Stimulation von Caco-2- und Jurkat-Zellen mit IL-1 $\beta$  gezeigt wurde, dass NF- $\kappa$ B mit Faktoren aus der C/EBP-Familie und der AP-1-Familie bei der Verstärkung der IL-8/CXCL8-Transkription zusammenwirkt [Kunsch et al., 1994; Wu et al., 1997], ist denkbar, dass ähnliche synergistische Effekte bei der LPS-induzierten Signaltransduktion wirksam werden und Ursache für die unterschiedliche Hemmung der beiden Reporter durch RhoAN19 sind. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass das quantitative Muster der Hemmung der Reporterexpression in CHO-3E10 genau dem Muster der Expression von IL-8/CXCL8 in Endothelzellen mit der stärksten Reduktion unter Rac1N17 entspricht.

### 5.6.2 Minderung des Reportersignals mit steigender Überexpression von Rac1N17

Die überexprimierte inaktive Mutante einer GTPase konkurriert mit dem zelleigenen Wildtyp um flussaufwärts stehende Bindungspartner, die jeweiligen GEFs der GTPase, und bindet diese GEFs ohne Konformationsänderung, so dass das Signal nicht weitergeleitet wird [Feig, 1999]. Um eine effektive Blockade der Signalweiterleitung zu bewirken, muss eine hinreichende Menge an inaktivem Protein exprimiert werden. Diese Menge ist abhängig von der jeweiligen GTPase, dem jeweiligen biologischen Effekt, den sie vermittelt, und dem Zelltyp [Feig, 1999]. Für RasN17 wird diese Menge von Feig mit dem 2–3fachen des zellulären Wildtypproteins für eine komplette Inhibition angegeben. Dementsprechend sollte vor Erreichen einer kompletten Inhibition eine „Dosisabhängigkeit“ von der Menge an überexprimierter Proteinvariante nachzuweisen sein. Diese Dosisabhängigkeit konnte für die Reporterexpression in CHO-3E10 unter Rac1N17 gezeigt werden, aber nicht für RhoA und Cdc42. Erklärend für die nicht gezeigte Dosisabhängigkeit bei RhoAN19 und Cdc42N17 kann also ein niedrigeres Expressionsniveau an Wildtypprotein von RhoA und Cdc42 sein, so dass schon eine relativ geringe Expression der Mutanten komplett inhibierend wirkt. Speziell für die in dieser Arbeit verwendete inaktive Mutante von RhoA kommt hinzu, dass diese Mutante RhoAN19 eine weitere Mutation (F25N) zur Erhöhung der Proteinstabilität aufweist [Self und Hall, 1995], so dass möglicherweise aufgrund unterschiedlicher Kinetik des Proteinumsatzes für EGFP und RhoAN19 gar kein proportionales Verhältnis zwischen EGFP-bedingter Fluoreszenzintensität und der Masse an zellulärem RhoAN19 besteht. Unabhängig von den Gründen für die fehlende Dosisabhängigkeit der Reportersignalreduktion unter RhoAN17 und Cdc42N17 ist bemerkenswert, dass für die Zellen mit maximaler Überexpression von Rac1N17 eine Signalreduktion bis auf 33 % des Kontrollwerts gegenüber einem mittleren Wert von 49 % für alle Rac1N17 überexprimierenden Zellen gemessen wurde. Das deutet darauf hin, dass der Inhibition von Rac1 in der LPS-induzierten Signalkaskade im Vergleich zu RhoA und Cdc42 eine herausragende Bedeutung zukommt. Jüngst wurde ein *für Rac spezifischer* biochemischer Inhibitor identifiziert [Gao et al., 2004]. Dieser kann möglicherweise auch für die Modulation der inflammatorischen Signalwege eingesetzt werden.

## 5.7 Generation der Linien CHO-RhoAN19 und CHO-Cdc42N17

Für die neu generierten Linien CHO-RhoAN19 und CHO-Cdc42N17 wurde zunächst mittels Western-Blot die *Expression* der jeweiligen inaktiven Mutanten nachgewiesen. Anschließend wurde die *funktionelle Wirksamkeit* der exprimierten inaktiven Mutanten gezeigt, indem in der Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie jeweils eine charakteristische Zellmorphologie gezeigt wurde. Konfokalmikroskopisch konnte als Ursache der jeweiligen Morphologie eine unterschiedliche Kondensation von Aktinfilamenten zu Stressfasern nachgewiesen werden. Die jeweils gezeigten Veränderungen des Zytoskeletts gegenüber der Referenzlinie CHO-3E10 stimmen mit den in der Literatur für ähnliche Zelllinien beschriebenen Veränderungen weitgehend überein. Qui und Chen haben die Ratten-Fibroblastenlinie Rat1 mit inaktivem RhoAN19, aktivem RhoAV14 und Leervektor stabil transfiziert [Qiu et al., 1995]. Nach Anfärbung der Aktinfilamente mit FITC-Phalloidin berichten die Autoren eine Zunahme an Stressfasern für die RhoAV14-Linie und eine Abnahme an Stressfasern für die RhoAN19-Linie im Vergleich zur mit Leervektor transfizierten Linie in der Immunfluoreszenzmikroskopie [Qiu et al., 1995]. Die gleiche Veränderung – Abnahme an Stressfasern – konnte unter 4.6.2 in Abbildung 24 für CHO-RhoAN19 gezeigt werden. Für CHO-RhoAN19 wurden zusätzlich auch geringere Zell-Zell-Kontakte als für CHO-3E10 gezeigt, was durch die in der Literatur beschriebene Hemmung von Fokalen Adhäsionen erklärt werden kann. Ebenfalls von Qiu wurden stabil mit Cdc42N17 und aktivem Cdc42 transfizierte Zelllinien generiert [Qiu et al., 1997]. Für die mit *aktivem* Cdc42 transfizierte Linie beschreibt Qiu eine Abnahme an Stressfasern im Vergleich zur mit Leervektor transfizierten Kontrolllinie und der mit Cdc42N17 transfizierten Linie. Für die Cdc42N17-Linie wären gegenteilig zur mit aktivem Cdc42 transfizierten Linie ausgeprägte Stressfasern zu erwarten. Der Autor berichtet allerdings, dass der entsprechende Klon die inaktive Proteinvariante nur in sehr geringer Menge überexprimiert, und führt die fehlende Veränderung gegenüber der Kontrolllinie in seiner Diskussion darauf zurück, dass die geringe Überexpression von Cdc42N17 für eine funktionelle Wirksamkeit nicht hinreichend ist [Qiu et al., 1997]. Die in dieser Arbeit generierte Linie CHO-Cdc42N17 überexprimiert das inaktive Cdc42N17 sehr stark, wie an einer ausgeprägten Fluoreszenz des unter dem IRES-Element im Verhältnis 1 : 2,5 [Mizuguchi et al., 2000] gegenüber Cdc42N17 exprimierten EGFP zu sehen ist. Die im FACS gemessene Fluoreszenzintensität lag im Bereich  $10^3$  und damit am

oberen Rand der Skala. Dementsprechend zeigt die Linie auch ausgeprägte, kabelförmige Stressfasern.

Die Diskussion der stabil transfizierten Linien zusammengefasst, wurden sowohl die Proteinexpression von RhoAN19 und Cdc42N17 als auch deren funktionelle Wirksamkeit auf die Zytomorphologie gezeigt. Nachdem in dieser Arbeit die Wirkung der Überexpression inaktiver Mutanten von RhoA, Rac1 und Cdc42 nach *transienter* Transfektion in Endothel- und CHO-Zellen auf den LPS-induzierten Signalweg nachgewiesen wurde, stellen die *stabil* transfizierten Linien möglicherweise ein Werkzeug zum weiteren Studium des untersuchten Signalwegs dar.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aird, W. C. (2003): The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome, *Blood* (Band 101), Nr. 10, Seite 3765-77.
- Akira, S.; Isshiki, H.; Sugita, T.; Tanabe, O.; Kinoshita, S.; Nishio, Y.; Nakajima, T.; Hirano, T. und Kishimoto, T. (1990): A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family, *Embo J* (Band 9), Nr. 6, Seite 1897-906.
- Aktories, K. und Hall, A. (1989): Botulinum ADP-ribosyltransferase C3: a new tool to study low molecular weight GTP-binding proteins, *Trends Pharmacol Sci* (Band 10), Nr. 10, Seite 415-8.
- Albelda, S. M.; Oliver, P. D.; Romer, L. H. und Buck, C. A. (1990): EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule, *J Cell Biol* (Band 110), Nr. 4, Seite 1227-37.
- Almog, Y. (2003): Statins, inflammation, and sepsis: hypothesis, *Chest* (Band 124), Nr. 2, Seite 740-3.
- Almog, Y.; Shefer, A.; Novack, V.; Maimon, N.; Barski, L.; Eizinger, M.; Friger, M.; Zeller, L. und Danon, A. (2004): Prior statin therapy is associated with a decreased rate of severe sepsis, *Circulation* (Band 110), Nr. 7, Seite 880-5. Epub 2004 Aug 02.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool, *J Mol Biol* (Band 215), Nr. 3, Seite 403-10.
- Andonegui, G.; Bonder, C. S.; Green, F.; Mullaly, S. C.; Zbytniuk, L.; Raharjo, E. und Kubes, P. (2003): Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs, *J Clin Invest* (Band 112), Nr. 8, Seite 1264.
- Arbibe, L.; Mira, J. P.; Teusch, N.; Kline, L.; Guha, M.; Mackman, N.; Godowski, P. J.; Ulevitch, R. J. und Knaus, U. G. (2000): Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway, *Nat Immunol* (Band 1), Nr. 6, Seite 533-40.
- Arditi, M.; Zhou, J.; Torres, M.; Durden, D. L.; Stins, M. und Kim, K. S. (1995): Lipopolysaccharide stimulates the tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinases p44, p42, and p41 in vascular endothelial cells in a soluble CD14-dependent manner. Role of protein tyrosine phosphorylation in lipopolysaccharide-induced stimulation of endothelial cells, *J Immunol* (Band 155), Nr. 8, Seite 3994-4003.
- Aspenstrom, P.; Fransson, A. und Saras, J. (2003): The Rho GTPases have diverse effects on the organisation of the actin filament system, *Biochem J* (Band 1).
- Axel, D. I.; Spyridopoulos, I.; Riessen, R.; Runge, H.; Viebahn, R. und Karsch, K. R. (2000): Toxicity, uptake kinetics and efficacy of new transfection reagents: increase of oligonucleotide uptake, *J Vasc Res* (Band 37), Nr. 4, Seite 221-34; discussion 303-4.
- Baggiolini, M.; Dewald, B. und Moser, B. (1997): Human chemokines: an update, *Annu Rev Immunol* (Band 15), Seite 675-705.
- Bagrodia, S.; Derijard, B.; Davis, R. J. und Cerione, R. A. (1995): Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation, *J Biol Chem* (Band 270), Nr. 47, Seite 27995-8.
- Baldwin, A. S., Jr. (2001): Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease, *J Clin Invest* (Band 107), Nr. 1, Seite 3-6.
- Baldwin, A. S., Jr.; Azizkhan, J. C.; Jensen, D. E.; Beg, A. A. und Coodly, L. R. (1991): Induction of NF-kappa B DNA-binding activity during the G0-to-G1 transition in mouse fibroblasts, *Mol Cell Biol* (Band 11), Nr. 10, Seite 4943-51.
- Barbieri, J. T.; Riese, M. J. und Aktories, K. (2002): Bacterial toxins that modify the actin cytoskeleton, *Annu Rev Cell Dev Biol* (Band 18), Seite 315-44. Epub 2002 Apr 02.

- Barnes, P. J. und Karin, M. (1997): Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases, *N Engl J Med* (Band 336), Nr. 15, Seite 1066-71.
- Bernard, G. R.; Vincent, J. L.; Laterre, P. F.; LaRosa, S. P.; Dhainaut, J. F.; Lopez-Rodriguez, A.; Steingrub, J. S.; Garber, G. E.; Helterbrand, J. D.; Ely, E. W. und Fisher, C. J., Jr. (2001): Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis, *N Engl J Med* (Band 344), Nr. 10, Seite 699-709.
- Beutler, B. und Poltorak, A. (2000): Positional cloning of Lps, and the general role of toll-like receptors in the innate immune response, *Eur Cytokine Netw* (Band 11), Nr. 2, Seite 143-52.
- Biffi, W. L.; Moore, E. E.; Moore, F. A.; Carl, V. S.; Franciose, R. J. und Banerjee, A. (1995): Interleukin-8 increases endothelial permeability independent of neutrophils, *J Trauma* (Band 39), Nr. 1, Seite 98-102; discussion 102-3.
- Bishop, A. L. und Hall, A. (2000): Rho GTPases and their effector proteins, *Biochem J* (Band 348), Nr. Pt 2, Seite 241-55.
- Bone, R. C.; Balk, R. A.; Cerra, F. B.; Dellinger, R. P.; Fein, A. M.; Knaus, W. A.; Schein, R. M. und Sibbald, W. J. (1992): Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine, *Chest* (Band 101), Nr. 6, Seite 1644-55.
- Bourne, H. R.; Sanders, D. A. und McCormick, F. (1991): The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism, *Nature* (Band 349), Nr. 6305, Seite 117-27.
- Branger, J.; van den Blink, B.; Weijer, S.; Madwed, J.; Bos, C. L.; Gupta, A.; Yong, C. L.; Polmar, S. H.; Olszyna, D. P.; Hack, C. E.; van Deventer, S. J.; Peppelenbosch, M. P. und van der Poll, T. (2002): Anti-inflammatory effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia, *J Immunol* (Band 168), Nr. 8, Seite 4070-7.
- Bretz, J. D.; Williams, S. C.; Baer, M.; Johnson, P. F. und Schwartz, R. C. (1994): C/EBP-related protein 2 confers lipopolysaccharide-inducible expression of interleukin 6 and monocyte chemoattractant protein 1 to a lymphoblastic cell line, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 91), Nr. 15, Seite 7306-10.
- Calvert, P. M. und Frucht, H. (2002): The genetics of colorectal cancer, *Ann Intern Med* (Band 137), Nr. 7, Seite 603-12.
- Car, B. D.; Meloni, F.; Luisetti, M.; Semenzato, G.; Gialdroni-Grassi, G. und Walz, A. (1994): Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis, *Am J Respir Crit Care Med* (Band 149), Nr. 3 Pt 1, Seite 655-9.
- Chalfie, Martin und Kain, Steven (1998): *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols*, 1. Auflage, Wiley-Liss, ISBN: 0-471-17839-X.
- Chardin, P.; Boquet, P.; Madaule, P.; Popoff, M. R.; Rubin, E. J. und Gill, D. M. (1989): The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells, *Embo J* (Band 8), Nr. 4, Seite 1087-92.
- Chaves-Olarte, E.; Freer, E.; Parra, A.; Guzman-Verri, C.; Moreno, E. und Thelestam, M. (2003): R-Ras glucosylation and transient RhoA activation determine the cytopathic effect produced by toxin B variants from toxin A-negative strains of Clostridium difficile, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 10, Seite 7956-63. Epub 2002 Dec 19.
- Chen, L. Y.; Zuraw, B. L.; Liu, F. T.; Huang, S. und Pan, Z. K. (2002): IL-1 receptor-associated kinase and low molecular weight GTPase RhoA signal molecules are required for bacterial lipopolysaccharide-induced cytokine gene transcription, *J Immunol* (Band 169), Nr. 7, Seite 3934-9.
- Chen, L. Y.; Zuraw, B. L.; Zhao, M.; Liu, F. T.; Huang, S. und Pan, Z. K. (2003): Involvement of protein tyrosine kinase in Toll-like receptor 4-mediated NF-kappa B activation in human peripheral blood monocytes, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (Band 284), Nr. 4, Seite L607-13.



- Chow, J. C.; Young, D. W.; Golenbock, D. T.; Christ, W. J. und Gusovsky, F. (1999): Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction, *J Biol Chem* (Band 274), Nr. 16, Seite 10689-92.
- Coso, O. A.; Chiariello, M.; Yu, J. C.; Teramoto, H.; Crespo, P.; Xu, N.; Miki, T. und Gutkind, J. S. (1995): The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway, *Cell* (Band 81), Nr. 7, Seite 1137-46.
- Dahinden, C. A.; Kurimoto, J.; Baggiolini, M.; Dewald, B. und Walz, A. (1989): Histamine and sulfidoleukotriene release from human basophils: different effects of antigen, anti-IgE, C5a, f-Met-Leu-Phe and the novel neutrophil-activating peptide NAF, *Int Arch Allergy Appl Immunol* (Band 90), Nr. 2, Seite 113-8.
- De Beaux, A. C.; Maingay, J. P.; Ross, J. A.; Fearon, K. C. und Carter, D. C. (1995): Interleukin-4 and interleukin-10 increase endotoxin-stimulated human umbilical vein endothelial cell interleukin-8 release, *J Interferon Cytokine Res* (Band 15), Nr. 5, Seite 441-5.
- de Martin, R.; Raidl, M.; Hofer, E. und Binder, B. R. (1997): Adenovirus-mediated expression of green fluorescent protein, *Gene Ther* (Band 4), Nr. 5, Seite 493-5.
- Delude, R. L.; Yoshimura, A.; Ingalls, R. R. und Golenbock, D. T. (1998): Construction of a lipopolysaccharide reporter cell line and its use in identifying mutants defective in endotoxin, but not TNF-alpha, signal transduction, *J Immunol* (Band 161), Nr. 6, Seite 3001-9.
- Devary, Y.; Rosette, C.; DiDonato, J. A. und Karin, M. (1993): NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal, *Science* (Band 261), Nr. 5127, Seite 1442-5.
- Diamond, Rochelle A und DeMaggio, Susan (2000): In *Living Color / Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting*, 1. Auflage, Springer Lab Manual, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, ISBN: 3-540-65149-7.
- Didsbury, J.; Weber, R. F.; Bokoch, G. M.; Evans, T. und Snyderman, R. (1989): rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates, *J Biol Chem* (Band 264), Nr. 28, Seite 16378-82.
- Djeu, J. Y.; Matsushima, K.; Oppenheim, J. J.; Shiotsuki, K. und Blanchard, D. K. (1990): Functional activation of human neutrophils by recombinant monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/IL-8, *J Immunol* (Band 144), Nr. 6, Seite 2205-10.
- Donnelly, S. C.; Strieter, R. M.; Kunkel, S. L.; Walz, A.; Robertson, C. R.; Carter, D. C.; Grant, I. S.; Pollok, A. J. und Haslett, C. (1993): Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups, *Lancet* (Band 341), Nr. 8846, Seite 643-7.
- Ducrest, A. L.; Amacker, M.; Lingner, J. und Nabholz, M. (2002): Detection of promoter activity by flow cytometric analysis of GFP reporter expression, *Nucleic Acids Res* (Band 30), Nr. 14, Seite e65.
- Dunne, A. und O'Neill, L. A. (2003): The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense, *Sci STKE* (Band 2003), Nr. 171, Seite re3.
- Ellis, R. W.; Defeo, D.; Shih, T. Y.; Gonda, M. A.; Young, H. A.; Tsuchida, N.; Lowy, D. R. und Scolnick, E. M. (1981): The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes, *Nature* (Band 292), Nr. 5823, Seite 506-11.
- Erridge, C.; Bennett-Guerrero, E. und Poxton, I. R. (2002): Structure and function of lipopolysaccharides, *Microbes Infect* (Band 4), Nr. 8, Seite 837-51.
- Essler, M.; Staddon, J. M.; Weber, P. C. und Aepfelbacher, M. (2000): Cyclic AMP blocks bacterial lipopolysaccharide-induced myosin light chain phosphorylation in endothelial cells through inhibition of Rho/Rho kinase signaling, *J Immunol* (Band 164), Nr. 12, Seite 6543-9.
- Etienne-Manneville, S. und Hall, A. (2002): Rho GTPases in cell biology, *Nature* (Band 420), Nr. 6916, Seite 629-35.

- Faure, E.; Equils, O.; Sieling, P. A.; Thomas, L.; Zhang, F. X.; Kirschning, C. J.; Polentarutti, N.; Muzio, M. und Arditi, M. (2000): Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 15, Seite 11058-63.
- Feig, L. A. (1999): Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases, *Nat Cell Biol* (Band 1), Nr. 2, Seite E25-7.
- Feig, L. A. und Cooper, G. M. (1988): Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP, *Mol Cell Biol* (Band 8), Nr. 8, Seite 3235-43.
- Feig, L. A.; Corbley, M.; Pan, B. T.; Roberts, T. M. und Cooper, G. M. (1987): Structure/function analysis of ras using random mutagenesis coupled with functional screening assays, *Mol Endocrinol* (Band 1), Nr. 2, Seite 127-36.
- Foletta, V. C.; Segal, D. H. und Cohen, D. R. (1998): Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1, *J Leukoc Biol* (Band 63), Nr. 2, Seite 139-52.
- Galanos, C.; Luderitz, O.; Rietschel, E. T.; Westphal, O.; Brade, H.; Brade, L.; Freudenberg, M.; Schade, U.; Imoto, M.; Yoshimura, H. und et al. (1985): Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities, *Eur J Biochem* (Band 148), Nr. 1, Seite 1-5.
- Gao, Y.; Dickerson, J. B.; Guo, F.; Zheng, J.; Zheng, Y.; Mitchell, T. und Sugden, B. (2004): Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 5), Nr. 5, Seite 5.
- Gay, N. J. und Keith, F. J. (1991): Drosophila Toll and IL-1 receptor, *Nature* (Band 351), Nr. 6325, Seite 355-6.
- Geerdes, H. F.; Ziegler, D.; Lode, H.; Hund, M.; Loehr, A.; Fangmann, W. und Wagner, J. (1992): Septicemia in 980 patients at a university hospital in Berlin: prospective studies during 4 selected years between 1979 and 1989, *Clin Infect Dis* (Band 15), Nr. 6, Seite 991-1002.
- Graham, F. L. und van der Eb, A. J. (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA, *Virology* (Band 52), Nr. 2, Seite 456-67.
- Haataja, L.; Groffen, J. und Heisterkamp, N. (1997): Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family, *J Biol Chem* (Band 272), Nr. 33, Seite 20384-8.
- Hack, C. E.; Hart, M.; van Schijndel, R. J.; Eerenberg, A. J.; Nuijens, J. H.; Thijs, L. G. und Aarden, L. A. (1992): Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators, *Infect Immun* (Band 60), Nr. 7, Seite 2835-42.
- Hakoshima, T.; Shimizu, T. und Maesaki, R. (2003): Structural Basis of the Rho GTPase Signaling, *J Biochem (Tokyo)* (Band 134), Nr. 3, Seite 327-31.
- Hall, A. (1990): The cellular functions of small GTP-binding proteins, *Science* (Band 249), Nr. 4969, Seite 635-40.
- Harada, A.; Mukaida, N. und Matsushima, K. (1996): Interleukin 8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory diseases, *Mol Med Today* (Band 2), Nr. 11, Seite 482-9.
- Hazzalin, C. A. und Mahadevan, L. C. (2002): MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch?, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 3), Nr. 1, Seite 30-40.
- Heim, R.; Cubitt, A. B. und Tsien, R. Y. (1995): Improved green fluorescence, *Nature* (Band 373), Nr. 6516, Seite 663-4.
- Heine, H.; Kirschning, C. J.; Lien, E.; Monks, B. G.; Rothe, M. und Golenbock, D. T. (1999): Cutting edge: cells that carry A null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin, *J Immunol* (Band 162), Nr. 12, Seite 6971-5.

- Henneke, P. und Golenbock, D. T. (2002): Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells, *Crit Care Med* (Band 30), Nr. 5 Suppl, Seite S207-13.
- Hewett, P. W. und Murray, J. C. (1996): Coexpression of flt-1, flt-4 and KDR in freshly isolated and cultured human endothelial cells, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 221), Nr. 3, Seite 697-702.
- Hippenstiel, S.; Schmeck, B.; N'Guessan, P. D.; Seybold, J.; Krull, M.; Preissner, K.; Eichel-Streiber, C. V. und Suttorp, N. (2002a): Rho protein inactivation induced apoptosis of cultured human endothelial cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (Band 283), Nr. 4, Seite L830-8.
- Hippenstiel, S.; Schmeck, B.; Seybold, J.; Krull, M.; Eichel-Streiber, C.; Suttorp, N. (2002b): Reduction of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) related nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) translocation but not inhibitor  $\kappa$ B (Ikappa-B)-degradation by Rho protein inhibition in human endothelial cells, *Biochem Pharmacol* (Band 64), Nr. 5-6, Seite 971-7.
- Hippenstiel, S.; Soeth, S.; Kellas, B.; Fuhrmann, O.; Seybold, J.; Krull, M.; Eichel-Streiber, C.; Goebeler, M.; Ludwig, S. und Suttorp, N. (2000): Rho proteins and the p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells, *Blood* (Band 95), Nr. 10, Seite 3044-51.
- Hirschfeld, M.; Ma, Y.; Weis, J. H.; Vogel, S. N. und Weis, J. J. (2000): Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2, *J Immunol* (Band 165), Nr. 2, Seite 618-22.
- Hobert, M. E.; Sands, K. A.; Mrsny, R. J. und Madara, J. L. (2002): Cdc42 and Rac1 regulate late events in Salmonella typhimurium-induced interleukin-8 secretion from polarized epithelial cells, *J Biol Chem* (Band 277), Nr. 52, Seite 51025-32. Epub 2002 Oct 14.
- Hoffmann, C. und Schmidt, G. (2004): CNF and DNT, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* (Band 152), Nr. 1, Seite 49-63. Epub 2004 Jul 29.
- Hoffmann, E.; Dittrich-Breiholz, O.; Holtmann, H. und Kracht, M. (2002): Multiple control of interleukin-8 gene expression, *J Leukoc Biol* (Band 72), Nr. 5, Seite 847-55.
- Hoshino, K.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Sanjo, H.; Ogawa, T.; Takeda, Y.; Takeda, K. und Akira, S. (1999): Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product, *J Immunol* (Band 162), Nr. 7, Seite 3749-52.
- Hotchkiss, R. S. und Karl, I. E. (2003): The pathophysiology and treatment of sepsis, *N Engl J Med* (Band 348), Nr. 2, Seite 138-50.
- Hou, J.; Baichwal, V. und Cao, Z. (1994): Regulatory elements and transcription factors controlling basal and cytokine-induced expression of the gene encoding intercellular adhesion molecule 1, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 91), Nr. 24, Seite 11641-5.
- Huber, A. R.; Kunkel, S. L.; Todd, R. F., 3rd und Weiss, S. J. (1991): Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8, *Science* (Band 254), Nr. 5028, Seite 99-102.
- Ikeda, U. und Shimada, K. (1999): Statins and monocytes, *Lancet* (Band 353), Nr. 9169, Seite 2070.
- Ingalls, R. R.; Rice, P. A.; Qureshi, N.; Takayama, K.; Lin, J. S. und Golenbock, D. T. (1995): The inflammatory cytokine response to Chlamydia trachomatis infection is endotoxin mediated, *Infect Immun* (Band 63), Nr. 8, Seite 3125-30.
- Inoue, I.; Goto, S.; Mizotani, K.; Awata, T.; Mastunaga, T.; Kawai, S.; Nakajima, T.; Hokari, S.; Komoda, T. und Katayama, S. (2000): Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) in primary endothelial cells, *Life Sci* (Band 67), Nr. 8, Seite 863-76.
- Jaffe, A. B. und Hall, A. (2002): Rho GTPases in transformation and metastasis, *Adv Cancer Res* (Band 84), Seite 57-80.
- Jaffe, E. A. (1987): Cell biology of endothelial cells, *Hum Pathol* (Band 18), Nr. 3, Seite 234-9.

- Jaffe, E. A.; Hoyer, L. W. und Nachman, R. L. (1974): Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 71), Nr. 5, Seite 1906-9.
- Jensen, L. E. und Whitehead, A. S. (2003): ELAM-1/E-selectin promoter contains an inducible AP-1/CREB site and is not NF-kappa B-specific, *Biotechniques* (Band 35), Nr. 1, Seite 54-6, 58.
- Jung, T.; Schauer, U.; Heusser, C.; Neumann, C. und Rieger, C. (1993): Detection of intracellular cytokines by flow cytometry, *J Immunol Methods* (Band 159), Nr. 1-2, Seite 197-207.
- Just, I.; Mohr, C.; Schallehn, G.; Menard, L.; Didsbury, J. R.; Vandekerckhove, J.; van Damme, J. und Aktories, K. (1992): Purification and characterization of an ADP-ribosyltransferase produced by *Clostridium limosum*, *J Biol Chem* (Band 267), Nr. 15, Seite 10274-80.
- Kiefer, K.; Clement, J.; Garidel, P. und Peschka-Suss, R. (2004): Transfection efficiency and cytotoxicity of nonviral gene transfer reagents in human smooth muscle and endothelial cells, *Pharm Res* (Band 21), Nr. 6, Seite 1009-17.
- Koga, T. (1993): Neutrophilia and high level of interleukin 8 in the bronchoalveolar lavage fluid of diffuse panbronchiolitis, *Kurume Med J* (Band 40), Nr. 3, Seite 139-46.
- Kowalski, J. und Denhardt, D. T. (1989): Regulation of the mRNA for monocyte-derived neutrophil-activating peptide in differentiating HL60 promyelocytes, *Mol Cell Biol* (Band 9), Nr. 5, Seite 1946-57.
- Krump-Konvalinkova, V.; Bittinger, F.; Unger, R. E.; Peters, K.; Lehr, H. A. und Kirkpatrick, C. J. (2001): Generation of human pulmonary microvascular endothelial cell lines, *Lab Invest* (Band 81), Nr. 12, Seite 1717-27.
- Kumar, S.; Boehm, J. und Lee, J. C. (2003): p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases, *Nat Rev Drug Discov* (Band 2), Nr. 9, Seite 717-26.
- Kunsch, C.; Lang, R. K.; Rosen, C. A. und Shannon, M. F. (1994): Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6, *J Immunol* (Band 153), Nr. 1, Seite 153-64.
- Kyriakis, J. M. und Avruch, J. (2001): Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation, *Physiol Rev* (Band 81), Nr. 2, Seite 807-69.
- Larsen, C. G.; Anderson, A. O.; Appella, E.; Oppenheim, J. J. und Matsushima, K. (1989): The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes, *Science* (Band 243), Nr. 4897, Seite 1464-6.
- LeClair, K. P.; Blannar, M. A. und Sharp, P. A. (1992): The p50 subunit of NF-kappa B associates with the NF-IL6 transcription factor, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 89), Nr. 17, Seite 8145-9.
- Lee, W.; Haslinger, A.; Karin, M. und Tjian, R. (1987): Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40, *Nature* (Band 325), Nr. 6102, Seite 368-72.
- Li, J.; Kartha, S.; Iasovskaia, S.; Tan, A.; Bhat, R. K.; Manaligod, J. M.; Page, K.; Brasier, A. R. und Hershenson, M. B. (2002): Regulation of human airway epithelial cell IL-8 expression by MAP kinases, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (Band 283), Nr. 4, Seite L690-9.
- Lien, E.; Ingalls, R. R.; Van Amersfoort, E. S.; Van Berkel, T. J. und Kuiper, J. (2002): Toll-like receptors, *Crit Care Med* (Band 30), Nr. 1 Supp, Seite S1-S11.
- Liu, X.; Constantinescu, S. N.; Sun, Y.; Bogan, J. S.; Hirsch, D.; Weinberg, R. A. und Lodish, H. F. (2000): Generation of mammalian cells stably expressing multiple genes at predetermined levels, *Anal Biochem* (Band 280), Nr. 1, Seite 20-8.
- Madaule, P. und Axel, R. (1985): A novel ras-related gene family, *Cell* (Band 41), Nr. 1, Seite 31-40.
- Mahalingam, S. und Karupiah, G. (1999): Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases, *Immunol Cell Biol* (Band 77), Nr. 6, Seite 469-75.

- Martin, S. G. und Murray, J. C. (2000): Gene-transfer systems for human endothelial cells. [stewart.martin@nottingham.ac.uk](mailto:stewart.martin@nottingham.ac.uk), *Adv Drug Deliv Rev* (Band 41), Nr. 2, Seite 223-33.
- Martin, T.; Cardarelli, P. M.; Parry, G. C.; Felts, K. A. und Cobb, R. R. (1997): Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1, *Eur J Immunol* (Band 27), Nr. 5, Seite 1091-7.
- Martinez-Pellus, A. E.; Merino, P.; Bru, M.; Canovas, J.; Seller, G.; Sapina, J.; Fuentes, T. und Moro, J. (1997): Endogenous endotoxemia of intestinal origin during cardiopulmonary bypass. Role of type of flow and protective effect of selective digestive decontamination, *Intensive Care Med* (Band 23), Nr. 12, Seite 1251-7.
- Matsusaka, T.; Fujikawa, K.; Nishio, Y.; Mukaida, N.; Matsushima, K.; Kishimoto, T. und Akira, S. (1993): Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 90), Nr. 21, Seite 10193-7.
- McCloskey, R. V.; Straube, R. C.; Sanders, C.; Smith, S. M. und Smith, C. R. (1994): Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CHES Trial Study Group, *Ann Intern Med* (Band 121), Nr. 1, Seite 1-5.
- Medzhitov, R. (2001): Toll-like receptors and innate immunity, *Nat Rev Immunol* (Band 1), Nr. 2, Seite 135-45.
- Medzhitov, R. und Janeway, C., Jr. (2000): Innate immunity, *N Engl J Med* (Band 343), Nr. 5, Seite 338-44.
- Medzhitov, R.; Preston-Hurlburt, P.; Kopp, E.; Stadlen, A.; Chen, C.; Ghosh, S. und Janeway, C. A., Jr. (1998): MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways, *Mol Cell* (Band 2), Nr. 2, Seite 253-8.
- Michiels, C. (2003): Endothelial cell functions, *J Cell Physiol* (Band 196), Nr. 3, Seite 430-43.
- Miller, E. J.; Cohen, A. B. und Matthay, M. A. (1996): Increased interleukin-8 concentrations in the pulmonary edema fluid of patients with acute respiratory distress syndrome from sepsis, *Crit Care Med* (Band 24), Nr. 9, Seite 1448-54.
- Minden, A.; Lin, A.; Claret, F. X.; Abo, A. und Karin, M. (1995): Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs, *Cell* (Band 81), Nr. 7, Seite 1147-57.
- Mitchell, T. und Sugden, B. (1995): Stimulation of NF-kappa B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus, *J Virol* (Band 69), Nr. 5, Seite 2968-76.
- Mizuguchi, H.; Xu, Z.; Ishii-Watabe, A.; Uchida, E. und Hayakawa, T. (2000): IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector, *Mol Ther* (Band 1), Nr. 4, Seite 376-82.
- Mountford, P. S. und Smith, A. G. (1995): Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis, *Trends Genet* (Band 11), Nr. 5, Seite 179-84.
- Mukaida, N. (2000): Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation, *Int J Hematol* (Band 72), Nr. 4, Seite 391-8.
- Mukaida, N. (2003): Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (Band 284), Nr. 4, Seite L566-77.
- Mukaida, N.; Mahe, Y. und Matsushima, K. (1990): Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines, *J Biol Chem* (Band 265), Nr. 34, Seite 21128-33.
- Munemitsu, S.; Innis, M. A.; Clark, R.; McCormick, F.; Ullrich, A. und Polakis, P. (1990): Molecular cloning and expression of a G25K cDNA, the human homolog of the yeast cell cycle gene CDC42, *Mol Cell Biol* (Band 10), Nr. 11, Seite 5977-82.

- Murphy, P. M.; Baggiolini, M.; Charo, I. F.; Hebert, C. A.; Horuk, R.; Matsushima, K.; Miller, L. H.; Oppenheim, J. J. und Power, C. A. (2000): International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors, *Pharmacol Rev* (Band 52), Nr. 1, Seite 145-76.
- Nathan, C. (2002): Points of control in inflammation, *Nature* (Band 420), Nr. 6917, Seite 846-52.
- Nikaido, H. and Vaara, M. (1987): Outer Membrane, Neidhardt, C., Ingrahm, J.L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umbarger, H. E., *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurum*. Cellular and Molecular Biology Seite 7-22, American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Nobes, C. D. und Hall, A. (1995): Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia, *Cell* (Band 81), Nr. 1, Seite 53-62.
- O'Neill, L. A. und Greene, C. (1998): Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants, *J Leukoc Biol* (Band 63), Nr. 6, Seite 650-7.
- Pagano, J. S.; McCutchan, J. H. und Vaheri, A. (1967): Factors influencing the enhancement of the infectivity of poliovirus ribonucleic acid by diethylaminoethyl-dextran, *J Virol* (Band 1), Nr. 5, Seite 891-7.
- Patel, T. R. und Corbett, S. A. (2003): Mevastatin suppresses lipopolysaccharide-induced Rac activation in the human monocyte cell line THP-1, *Surgery* (Band 134), Nr. 2, Seite 306-11.
- Perona, R.; Montaner, S.; Saniger, L.; Sanchez-Perez, I.; Bravo, R. und Lacal, J. C. (1997): Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins, *Genes Dev* (Band 11), Nr. 4, Seite 463-75.
- Peters, K.; Unger, R. E.; Brunner, J. und Kirkpatrick, C. J. (2003): Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis, *Cardiovasc Res* (Band 60), Nr. 1, Seite 49-57.
- Pierce, J. W.; Lenardo, M. und Baltimore, D. (1988): Oligonucleotide that binds nuclear factor NF-kappa B acts as a lymphoid-specific and inducible enhancer element, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 85), Nr. 5, Seite 1482-6.
- Pober, J. S. und Cotran, R. S. (1990): The role of endothelial cells in inflammation, *Transplantation* (Band 50), Nr. 4, Seite 537-44.
- Poltorak, A.; He, X.; Smirnova, I.; Liu, M. Y.; Van Huffel, C.; Du, X.; Birdwell, D.; Alejos, E.; Silva, M.; Galanos, C.; Freudenberg, M.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Layton, B. und Beutler, B. (1998): Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene, *Science* (Band 282), Nr. 5396, Seite 2085-8.
- Pugin, J.; Schurer-Maly, C. C.; Leturcq, D.; Moriarty, A.; Ulevitch, R. J. und Tobias, P. S. (1993): Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 90), Nr. 7, Seite 2744-8.
- Qiu, R. G.; Abo, A.; McCormick, F. und Symons, M. (1997): Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation, *Mol Cell Biol* (Band 17), Nr. 6, Seite 3449-58.
- Qiu, R. G.; Chen, J.; McCormick, F. und Symons, M. (1995): A role for Rho in Ras transformation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 92), Nr. 25, Seite 11781-5.
- Qureshi, N.; Takayama, K. und Kurtz, R. (1991): Diphosphoryl lipid A obtained from the nontoxic lipopolysaccharide of *Rhodopseudomonas sphaeroides* is an endotoxin antagonist in mice, *Infect Immun* (Band 59), Nr. 1, Seite 441-4.
- Ramji, D. P. und Foka, P. (2002): CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation, *Biochem J* (Band 365), Nr. Pt 3, Seite 561-75.
- Ramji, D. P.; Vitelli, A.; Tronche, F.; Cortese, R. und Ciliberto, G. (1993): The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/NF-IL6 and C/EBP delta/NF-IL6 beta, are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms, *Nucleic Acids Res* (Band 21), Nr. 2, Seite 289-94.

- Ridley, A. J. (1997): The GTP-binding protein Rho, *Int J Biochem Cell Biol* (Band 29), Nr. 11, Seite 1225-9.
- Ridley, A. J. (1999): Stress fibres take shape, *Nat Cell Biol* (Band 1), Nr. 3, Seite E64-6.
- Ridley, A. J. und Hall, A. (1992): The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors, *Cell* (Band 70), Nr. 3, Seite 389-99.
- Ridley, A. J.; Paterson, H. F.; Johnston, C. L.; Diekmann, D. und Hall, A. (1992): The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling, *Cell* (Band 70), Nr. 3, Seite 401-10.
- Rietschel, E. T.; Kirikae, T.; Schade, F. U.; Mamat, U.; Schmidt, G.; Loppnow, H.; Ulmer, A. J.; Zahringer, U.; Seydel, U.; Di Padova, F. und et al. (1994): Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function, *Faseb J* (Band 8), Nr. 2, Seite 217-25.
- Roebuck, K. A. (1999): Regulation of interleukin-8 gene expression, *J Interferon Cytokine Res* (Band 19), Nr. 5, Seite 429-38.
- Rosen, C. A.; Sodroski, J. G. und Haseltine, W. A. (1985): The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat, *Cell* (Band 41), Nr. 3, Seite 813-23.
- Schirmer, J. und Aktories, K. (2004): Large clostridial cytotoxins: cellular biology of Rho/Ras-glucosylating toxins, *Biochim Biophys Acta* (Band 1673), Nr. 1-2, Seite 66-74.
- Schmitz, M. L.; Bacher, S. und Kracht, M. (2001): I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations, *Trends Biochem Sci* (Band 26), Nr. 3, Seite 186-90.
- Schroder, J. M.; Mrowietz, U.; Morita, E. und Christophers, E. (1987): Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity, *J Immunol* (Band 139), Nr. 10, Seite 3474-83.
- Schumann, R. R.; Pfeil, D.; Lamping, N.; Kirschning, C.; Scherzinger, G.; Schlag, P.; Karawajew, L. und Herrmann, F. (1996): Lipopolysaccharide induces the rapid tyrosine phosphorylation of the mitogen-activated protein kinases erk-1 and p38 in cultured human vascular endothelial cells requiring the presence of soluble CD14, *Blood* (Band 87), Nr. 7, Seite 2805-14.
- Schwarzer, N.; Nost, R.; Seybold, J.; Parida, S. K.; Fuhrmann, O.; Krull, M.; Schmidt, R.; Newton, R.; Hippenstiel, S.; Domann, E.; Chakraborty, T. und Suttrop, N. (1998): Two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* induce ceramide generation, nuclear factor-kappa B activation, and E-selectin expression in human endothelial cells, *J Immunol* (Band 161), Nr. 6, Seite 3010-8.
- Self, A. J. und Hall, A. (1995): Purification of recombinant Rho/Rac/G25K from *Escherichia coli*, *Methods Enzymol* (Band 256), Seite 3-10.
- Sen, R. und Baltimore, D. (1986): Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences, *Cell* (Band 46), Nr. 5, Seite 705-16.
- Shih, T. Y.; Williams, D. R.; Weeks, M. O.; Maryak, J. M.; Vass, W. C. und Scolnick, E. M. (1978): Comparison of the genomic organization of Kirsten and Harvey sarcoma viruses, *J Virol* (Band 27), Nr. 1, Seite 45-55.
- Shimazu, R.; Akashi, S.; Ogata, H.; Nagai, Y.; Fukudome, K.; Miyake, K. und Kimoto, M. (1999): MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4, *J Exp Med* (Band 189), Nr. 11, Seite 1777-82.
- Shinjo, K.; Koland, J. G.; Hart, M. J.; Narasimhan, V.; Johnson, D. I.; Evans, T. und Cerione, R. A. (1990): Molecular cloning of the gene for the human placental GTP-binding protein Gp (G25K): identification of this GTP-binding protein as the human homolog of the yeast cell-division-cycle protein CDC42, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 87), Nr. 24, Seite 9853-7.
- Silverman, N. und Maniatis, T. (2001): NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity, *Genes Dev* (Band 15), Nr. 18, Seite 2321-42.

- Sodroski, J. G.; Rosen, C. A. und Haseltine, W. A. (1984): Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells, *Science* (Band 225), Nr. 4660, Seite 381-5.
- Spaargaren, M.; Bischoff, J. R. und McCormick, F. (1995): Signal transduction by Ras-like GTPases: a potential target for anticancer drugs, *Gene Expr* (Band 4), Nr. 6, Seite 345-56.
- Standiford, T. J.; Kunkel, S. L.; Greenberger, M. J.; Laichalk, L. L. und Strieter, R. M. (1996): Expression and regulation of chemokines in bacterial pneumonia, *J Leukoc Biol* (Band 59), Nr. 1, Seite 24-8.
- Stein, B. und Baldwin, A. S., Jr. (1993): Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B, *Mol Cell Biol* (Band 13), Nr. 11, Seite 7191-8.
- Stein, B.; Cogswell, P. C. und Baldwin, A. S., Jr. (1993): Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction, *Mol Cell Biol* (Band 13), Nr. 7, Seite 3964-74.
- Strieter, R. M. (2002): Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (Band 283), Nr. 4, Seite L688-9.
- Strieter, R. M. und Kunkel, S. L. (1994): Acute lung injury: the role of cytokines in the elicitation of neutrophils, *J Investig Med* (Band 42), Nr. 4, Seite 640-51.
- Strieter, R. M.; Kunkel, S. L.; Showell, H. J.; Remick, D. G.; Phan, S. H.; Ward, P. A. und Marks, R. M. (1989): Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta, *Science* (Band 243), Nr. 4897, Seite 1467-9.
- Takai, Y.; Sasaki, T. und Matozaki, T. (2001): Small GTP-binding proteins, *Physiol Rev* (Band 81), Nr. 1, Seite 153-208.
- Takeuchi, O.; Hoshino, K.; Kawai, T.; Sanjo, H.; Takada, H.; Ogawa, T.; Takeda, K. und Akira, S. (1999): Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components, *Immunity* (Band 11), Nr. 4, Seite 443-51.
- Tengku-Muhammad, T. S.; Hughes, T. R.; Ranki, H.; Cryer, A. und Ramji, D. P. (2000): Differential regulation of macrophage CCAAT-enhancer binding protein isoforms by lipopolysaccharide and cytokines, *Cytokine* (Band 12), Nr. 9, Seite 1430-6.
- Teramoto, H.; Crespo, P.; Coso, O. A.; Igishi, T.; Xu, N. und Gutkind, J. S. (1996): The small GTP-binding protein rho activates c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases in human kidney 293T cells. Evidence for a Pak-independent signaling pathway, *J Biol Chem* (Band 271), Nr. 42, Seite 25731-4.
- Terkeltaub, R.; Solan, J.; Barry, M., Jr.; Santoro, D. und Bokoch, G. M. (1994): Role of the mevalonate pathway of isoprenoid synthesis in IL-8 generation by activated monocytic cells, *J Leukoc Biol* (Band 55), Nr. 6, Seite 749-55.
- Trouet, D.; Nilius, B.; Voets, T.; Droogmans, G. und Eggermont, J. (1997): Use of a bicistronic GFP-expression vector to characterise ion channels after transfection in mammalian cells, *Pflugers Arch* (Band 434), Nr. 5, Seite 632-8.
- Unger, R. E.; Krump-Konvalinkova, V.; Peters, K. und Kirkpatrick, C. J. (2002): In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R, *Microvasc Res* (Band 64), Nr. 3, Seite 384-97.
- Van Amersfoort, E. S.; Van Berkel, T. J. und Kuiper, J. (2003): Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock, *Clin Microbiol Rev* (Band 16), Nr. 3, Seite 379-414.
- van Nieuw Amerongen, G. P. und van Hinsbergh, V. W. (2001): Cytoskeletal effects of rho-like small guanine nucleotide-binding proteins in the vascular system, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (Band 21), Nr. 3, Seite 300-11.



- Van Zee, K. J.; DeForge, L. E.; Fischer, E.; Marano, M. A.; Kenney, J. S.; Remick, D. G.; Lowry, S. F. und Moldawer, L. L. (1991): IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration, *J Immunol* (Band 146), Nr. 10, Seite 3478-82.
- Verbon, A.; Dekkers, P. E.; ten Hove, T.; Hack, C. E.; Pribble, J. P.; Turner, T.; Souza, S.; Axtelle, T.; Hoek, F. J.; van Deventer, S. J. und van der Poll, T. (2001): IC14, an anti-CD14 antibody, inhibits endotoxin-mediated symptoms and inflammatory responses in humans, *J Immunol* (Band 166), Nr. 5, Seite 3599-605.
- Wedel, A. und Ziegler-Heitbrock, H. W. (1995): The C/EBP family of transcription factors, *Immunobiology* (Band 193), Nr. 2-4, Seite 171-85.
- Wei, C. M.; Gibson, M.; Spear, P. G. und Scolnick, E. M. (1981): Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1, *J Virol* (Band 39), Nr. 3, Seite 935-44.
- Whitley, M. Z.; Thanos, D.; Read, M. A.; Maniatis, T. und Collins, T. (1994): A striking similarity in the organization of the E-selectin and beta interferon gene promoters, *Mol Cell Biol* (Band 14), Nr. 10, Seite 6464-75.
- Wilde, C.; Barth, H.; Sehr, P.; Han, L.; Schmidt, M.; Just, I. und Aktories, K. (2002): Interaction of the Rho-ADP-ribosylating C3 exoenzyme with RalA, *J Biol Chem* (Band 277), Nr. 17, Seite 14771-6.
- Wrighton, C. J.; Hofer-Warbinek, R.; Moll, T.; Eytner, R.; Bach, F. H. und de Martin, R. (1996): Inhibition of endothelial cell activation by adenovirus-mediated expression of I kappa B alpha, an inhibitor of the transcription factor NF-kappa B, *J Exp Med* (Band 183), Nr. 3, Seite 1013-22.
- Wu, G. D.; Lai, E. J.; Huang, N. und Wen, X. (1997): Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor, *J Biol Chem* (Band 272), Nr. 4, Seite 2396-403.
- Yoshimura, T.; Matsushima, K.; Tanaka, S.; Robinson, E. A.; Appella, E.; Oppenheim, J. J. und Leonard, E. J. (1987): Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 84), Nr. 24, Seite 9233-7.
- Zeuke, S.; Ulmer, A. J.; Kusumoto, S.; Katus, H. A. und Heine, H. (2002): TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS, *Cardiovasc Res* (Band 56), Nr. 1, Seite 126-34.
- Zhang, F. L. und Casey, P. J. (1996): Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences, *Annu Rev Biochem* (Band 65), Seite 241-69.
- Zhang, F. X.; Kirschning, C. J.; Mancinelli, R.; Xu, X. P.; Jin, Y.; Faure, E.; Mantovani, A.; Rothe, M.; Muzio, M. und Arditi, M. (1999): Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes, *J Biol Chem* (Band 274), Nr. 12, Seite 7611-4.
- Zhao, D.; Kuhnt-Moore, S.; Zeng, H.; Pan, A.; Wu, J. S.; Simeonidis, S.; Moyer, M. P. und Pothoulakis, C. (2002): Substance P-stimulated interleukin-8 expression in human colonic epithelial cells involves Rho family small GTPases, *Biochem J* (Band 368), Nr. Pt 2, Seite 665-72.
- Zhao, D.; Kuhnt-Moore, S.; Zeng, H.; Wu, J. S.; Moyer, M. P. und Pothoulakis, C. (2003): Neurotensin stimulates IL-8 expression in human colonic epithelial cells through Rho GTPase-mediated NF-kappa B pathways, *Am J Physiol Cell Physiol* (Band 284), Nr. 6, Seite C1397-404.
- Zheng, Y.; Hart, M. J. und Cerione, R. A. (1995): Guanine nucleotide exchange catalyzed by dbl oncogene product, *Methods Enzymol* (Band 256), Nr. 2, Seite 77-84.

## **7 Anhang**

### **7.1 Danksagung**

Für die Anregung des Themas und die Besorgung der verwendeten Zelllinien und der für die Genvarianten der Rho-Proteine codierenden Plasmide danke ich Herrn PD Dr. Stefan Hippenstiel und Herrn Prof. Norbert Suttorp. Herrn Dr. Bernd Schmeck gilt mein besonderer Dank für seine Einarbeitung in Methoden und seine kontinuierliche beratende Begleitung meiner Arbeit.

Bei Frau Kerstin Möhr, Frau Stefanie Preising und Frau Valerie Johnston bedanke ich mich sehr herzlich für ihren Rat und ihre Unterstützung bei der praktischen Laborarbeit.

Herrn Dr. Andreas Hocke danke ich für die Anfertigung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken, die mir durch ihre Unterstützung die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.

## **7.2 Erklärung an Eides statt**

Hiermit erkläre ich, Rolf Günter Weidmann, an Eides statt, dass die vorliegende Dissertationsarbeit von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die verwendete Literatur sind vollständig angegeben.